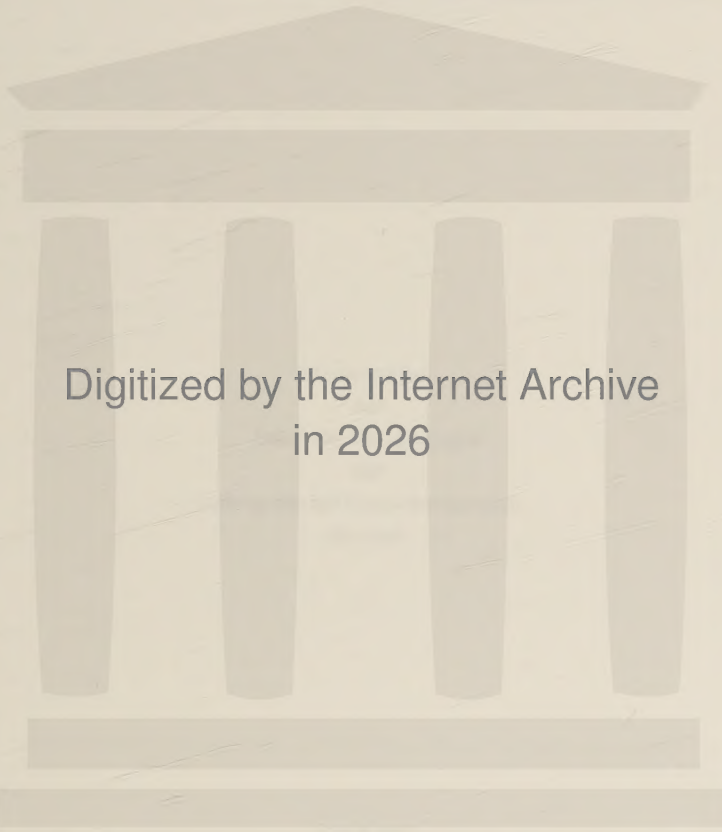


**Struktur- und Funktionsuntersuchungen
an cytoplasmatischen Enzymen
des extrem thermophilen Archaeobakteriums
Methanothermus fervidus:
Thermoadaptation und phylogenetische
Aspekte**

Stefan Fabry

Disbui. München

1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Struktur- und Funktionsuntersuchungen
an cytoplasmatischen Enzymen des extrem thermophilen Archaeobakteriums
Methanothermus fervidus:
Thermoadaptation und phylogenetische Aspekte

Dissertation
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Stefan Fabry
aus
München

Mai 1986 - Juli 1989

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. R. Hense1
2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Böck

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 10. 1989

Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei allen denjenigen bedanken, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle steht dabei selbstverständlich mein Doktorvater Dr. Reinhard Hensel, der mir die Bearbeitung des Themas vorschlug, der bei der experimentellen Durchführung geduldig mit Rat und Tat zur Seite stand, und dem ich besonders dafür dankbar bin, daß es niemals ein Problem gegeben hat, für dessen Lösung er nicht sofort bereitwillig und schnell seine volle Unterstützung angeboten hätte.

Mein Dank gilt weiter sowohl Herrn Prof. Dr. W. Zillig (MPI für Biochemie, Martinsried), der unserer Arbeitsgruppe den Laborplatz zur Verfügung stellte, uns außerordentlich großzügig mit Gerät und Verbrauchsmaterial unterstützte und darüberhinaus durch seine konstruktiven Diskussionen viele Denkanstöße gab, als auch Herrn Prof. Dr. K.O. Stetter (Universität Regensburg), der uns wiederholte Male freigiebig das erforderliche Zellmaterial zur Verfügung stellte, ohne das diese Arbeit nicht hätte durchgeführt werden können.

Ferner möchte ich nicht vergessen:

Alle derzeitigen und ehemaligen Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe, die unermüdlich durch Diskussion, Kritik und auch viel Kleinarbeit eine ständige Unterstützung waren sowie ebensoviel Humor zu unserem immer hervorragenden Arbeitsklima beigetragen haben:

Jutta Biro, die täglich Freud und Leid einer Promotionsarbeit mit mir teilte; die Diplomandinnen und Diplomanden Andrea Haas, Erika Honka, Peter Zwickl, Petra Heppner, Irmi Jakob und Christoph Bogedain; unseren "Postdoc" Dr. Anselm Lehmacher; die Technischen Assistentinnen Silvia Laumann und Karoline Felkl; sowie Wolfgang Dietmaier, der im Rahmen eines zweimonatigen Praktikums bei uns arbeitete.

Nicht unerwähnt bleiben dürfen auch:

Herr Dr. P. Palm (Abt. Prof. Dr. W. Zillig, MPI für Biochemie, Martinsried), der bei der Erstellung der phylogenetischen Stammbäume immer ein passendes Computerprogramm zur Hand hatte; Frau Uta Schimanko (Abt. Prof. Dr. D. Oesterheld, MPI für Biochemie, Martinsried), die für eine rasche und saubere Synthese der vielen erforderlichen Oligonukleotide sorgte; Prof. Dr. H.-J. Fritz (jetzt Universität Göttingen) und seine Mitarbeiter, die mich die gezielte Mutagenese lehrten; und verschiedene Mitarbeiter aus dem Genzentrum Martinsried, die mich bei den ersten Gehversuchen auf dem Gebiet der DNS-Sequenzierung unterstützten.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für das Promotionsstipendium, mit dem sie mich in den letzten beiden Jahren der Arbeit förderte.

Und dann - und nicht zuletzt!- will ich mich natürlich bei jenen bedanken, die mir zwar nicht fachlich, aber dafür mit umsomehr Verständnis und Geduld während der Zeit dieser Arbeit im privaten Bereich zur Seite gestanden sind und dabei sicher das eine oder andere Mal mehr Vernachlässigung in Kauf nehmen mußten, als vielleicht verzeihlich war:

Ich bedanke mich ganz besonders auch bei Marita und meinem Vater.

Inhaltsverzeichnis

<u>Vorbemerkung</u>	1
1. Bezeichnung von Mutanten und Mutagenese-Oligonukleotiden.....	1
2. Kurzausdrücke zur Umschreibung komplexerer Sachverhalte.....	1
3. Unterstützende Computerprogramme für Abbildungen und Text.....	2
4. Vorveröffentlichungen.....	3
<u>Einleitung</u>	4
<u>Material und Methoden</u>	10
1. Materialien.....	10
1.1 Bakterienstämme.....	10
1.1.1 <u>Methanothermobacter fervidus</u>	10
1.1.2 <u>Escherichia coli</u>	10
1.2 Phagen und Plasmide.....	10
1.3 Enzyme.....	11
1.4 Chemikalien.....	11
1.5 Geräte.....	13
2. Methoden.....	14
2.1 Arbeiten mit DNS.....	14
2.1.1 Grundlegende gentechnologische Verfahren.....	14
2.1.1.1 Anzucht und Aufbewahrung von Bakterien- und Phagenkulturen.....	14
2.1.1.2 Gewinnung von chromosomaler DNS.....	15
2.1.1.3 Rohpräparation von doppelsträngigen Plasmiden.....	15
(a) Plasmidminipräparation.....	15
(b) Plasmidpräparation nach alkalischer Lyse.....	16
(c) Plasmidpräparation nach Zell-Lyse mit Hilfe einer Detergenzienmischung.....	16
2.1.1.4 Chromatographische Reinigung von Plasmidrohpräparaten.....	16
(a) Reinigung mit Hilfe der HPLC-Anlage.....	16
(b) Plasmidreinigung mit QUIAGEN-Ionenaustauschermaterial.....	17
2.1.1.5 Gewinnung von einzelsträngigen Plasmiden.....	18
(a) Einzelsträngige M13mp18/19-Derivate.....	18
(b) Einzelsträngige pMa/c-Derivate.....	18
2.1.1.6 Restriktionsverdau.....	19
2.1.1.7 Agarose-Gelelektrophorese.....	19
2.1.1.8 Größenbestimmung von DNS-Restriktionsfragmenten.....	19
2.1.1.9 Gewinnung von Restriktionsfragmenten aus Agarosegelen.....	20
(a) Fragmentpräparation durch Ionenaustauschersäulen.....	20
(b) Fragmentpräparation mit Hilfe des GENE-CLEAN-Kits.....	20
2.1.1.10 DNS-Ligation.....	20
2.1.1.11 Modifikation überstehender DNS-Einzelstrang-Enden.....	21
2.1.1.12 Plasmidtransformation.....	21
(a) Transformation von <u>E. coli</u> JM 83, WK6 und WK6mutS.....	22
(b) Transformation von <u>E. coli</u> DH5 α	22
2.1.1.13 Größenselektion partialverdauter DNS-Fragmente durch Dichtegradientenzentrifugation.....	22
2.1.2 Aufbau von Plasmidgenbanken.....	23
2.1.2.1 Die verwendete Vektor-Wirt-Kombination.....	23
2.1.2.2 Auswahl und Aufbewahrung der Genbank-Klone.....	24
2.1.3 Isolation von Genen aus Plasmid-Genbanken.....	25
2.1.3.1 Synthese von Oligonukleotiden.....	25
2.1.3.2 Radioaktive Markierung der synthetischen Oligonukleotide.....	26
2.1.3.3 Kolonihybridisierung.....	26
2.1.3.4 Restriktionskartierung positiver Klone.....	26
2.1.3.5 Southern-Blot.....	27

2.1.4	DNS-Sequenzierung.....	27
2.1.4.1	Verwendete Enzyme.....	27
	(a) Sequenzierung mit Klenow-Polymerase.....	27
	(b) Sequenzierung mit dem Sequenase-Kit.....	28
2.1.4.2	Sequenzierstrategien.....	28
	(a) Gewinnung überlappender Subklone.....	28
	(b) Doppelstrang-Plasmid-Sequenzierung.....	29
	(c) Einzelstrang-Plasmid-Sequenzierung.....	31
2.1.4.3	Acrylamid-Gelelektrophorese.....	31
2.1.4.4	Autoradiographie.....	32
2.1.4.5	Aufarbeitung der Sequenzdaten.....	32
2.1.5	Gezielte Mutagenese.....	32
2.1.5.1	Das verwendete System.....	32
2.1.5.2	Vorgehen beim Gapped Duplex-Verfahren.....	34
	(a) Gewinnung der Einzelstrang-Matrize.....	34
	(b) Synthese und Phosphorylierung der Mutagenese-Oligonukleotide.....	37
	(c) Herstellung der Gapped Duplex.....	37
	(d) Hybridisierung des Mutagenese-Oligonukleotids an die Gapped Duplex.....	38
	(e) Polymerisation und Ligation.....	38
2.1.5.3	Selektion der Mutanten.....	38
2.1.6	Heterologe Expression archaebakterieller Gene in <u>E. coli</u>	39
2.1.6.1	Das verwendete System.....	39
2.1.6.2	Selektion exprimierender Klone.....	39
2.2	Arbeiten mit Proteinen.....	42
2.2.1	<u>M. fervidus</u> -GAPDH-Enzymtest.....	42
2.2.1.1	Vorwärts-Reaktion.....	42
2.2.1.2	Rückwärts-Reaktion.....	42
2.2.2	GAPDH-Enzymreinigung.....	43
2.2.2.1	Isolierung der <u>M. fervidus</u> -GAPDH aus <u>M. fervidus</u>	43
2.2.2.1	Isolierung der <u>M. fervidus</u> -GAPDH sowie von GAPDH-Mutinen aus <u>E. coli</u>	44
2.2.3	Bestimmung der Thermostabilität von GAPDH und GAPDH-Mutinen.....	45
2.2.4	Nachweis <u>E. coli</u> -exprimierter <u>M. fervidus</u> -MDH.....	45
2.2.4.1	MDH-Aktivitätstest.....	45
2.2.4.2	Gewinnung von <u>M. fervidus</u> -MDH aus <u>E. coli</u>	46
2.3	Computerunterstützte Proteinsequenzanalysen.....	47
2.3.1	Sequenzalignments und Konstruktion phylogenetischer Stammbäume.....	47
2.3.2	Berechnung physikalischer Strukturparameter.....	48
Ergebnisse.....		49
1.	Untersuchungen an der <u>M. fervidus</u> -GAPDH.....	49
1.1	Das gap-Gen und die daraus abgeleitete GAPDH-Primärstruktur.....	49
1.1.1	Isolierung und Sequenzierung des gap-Gens.....	49
1.1.1.1	Aufbau einer repräsentativen Plasmidgenbank.....	49
1.1.1.2	Genbank-Screening.....	51
1.1.1.3	Sequenzierung des gap-Gens.....	52
1.1.2	Sequenzeigenschaften des gap-Gens und der flankierenden DNS-Abschnitte.....	53
1.1.3	Sequenzvergleich der gap-Gene verschiedener Archaeobakterien.....	57
1.1.4	Aminosäuresequenz der <u>M. fervidus</u> -GAPDH.....	59
1.1.5	Aminosäuresequenz-Vergleich mit anderen bekannten GAPDHs.....	61
1.2	Expression der <u>M. fervidus</u> -GAPDH in <u>E. coli</u>	70
1.2.1	Konstruktion des Expressionsplasmids.....	72
1.2.2	Expression des <u>M. fervidus</u> -gap-Gens mit pJFgap-1.....	73
1.2.3	Optimierungsversuche zur Expressionsinduktion durch IPTG.....	73
1.2.4	Induktionsversuche mit Laktose.....	76
1.2.5	Präparation der <u>M. fervidus</u> -GAPDH aus <u>E. coli</u>	77
1.2.6	Vergleich zwischen der <u>M. fervidus</u> -GAPDH aus <u>E. coli</u> und der GAPDH aus dem Original-Organismus.....	78

1.3	Gezielte Mutagenese am gap-Gen von <u>M. fervidus</u>	80
1.3.1	Konstruktion geeigneter Plasmide.....	81
1.3.2	Durchführung der Mutationen.....	83
1.3.2.1	Verwendete Oligonukleotide.....	83
1.3.2.2	Erzielte Mutanten.....	87
1.3.3	Expression der mutierten gap-Gene in <u>E. coli</u>	88
1.3.3.1	Konstruktion der Expressionsplasmide.....	88
1.3.3.2	Expression mit pJgap-2.....	90
1.3.3.3	Isolierung mutierter Enzyme.....	90
1.4	Phänotypische Beschreibung der GAPDH-Mutante.....	93
1.4.1	Thermostabilität.....	94
1.4.2	Temperaturabhängigkeit der Aktivität.....	97
2.	Expression des mdh-Gens von <u>M. fervidus</u> in <u>E. coli</u>	103
2.1	Gezielte Mutagenese am mdh-Gen.....	103
2.1.1	Plasmidkonstruktion.....	106
2.1.2	Durchführung der Mutagenese.....	106
2.2	Gewinnung von <u>M. fervidus</u> -MDH aus <u>E. coli</u>	111
2.3	Vergleich der in <u>E. coli</u> exprimierten <u>M. fervidus</u> -MDH mit dem Original-Enzym.....	112
3.	Die Primärstruktur der <u>M. fervidus</u> -PGK.....	114
3.1	Klonierung und Sequenzierung des pgk-Gens.....	114
3.1.1	Aufbau und Screening einer angereicherten Genbank.....	114
3.1.2	Die Sequenz des pgk-Gens.....	116
3.2	Die Aminosäuresequenz der PGK.....	118
3.3	Aminosäuresequenz-Vergleich mit anderen bekannten PGKs.....	118
	<u>Diskussion</u>	124
1.	Struktur und Organisation von <u>M. fervidus</u> -Genen.....	124
1.1	GC-Gehalt.....	124
1.2	Transkriptionssignale.....	126
1.3	Ribosomenbindungsstellen.....	128
1.4	Translationsstart-Codons.....	128
1.5	Operonorganisation.....	129
2.	Heterologe Expression von <u>M. fervidus</u> -GAPDH und -MDH in <u>E. coli</u>	130
3.	Betrachtungen zur Thermoadaptation bei archaebakteriellen GAPDHs.....	134
3.1	Sequenzvergleich unter dem Aspekt der Thermophilie.....	134
3.2	Gezielte Mutagenese zur Eingrenzung der Thermophilie-spezifischen Strukturmerkmale der <u>M. fervidus</u> -GAPDH.....	140
3.2.1	Einfluß der Mutationen auf die Thermostabilität.....	142
3.2.2	Einfluß der Mutationen auf die Temperaturabhängigkeit der Aktivität.....	145
4.	Phylogenetische Aspekte.....	147
	<u>Zusammenfassung</u>	153
	<u>Alphabetisches Zitateverzeichnis</u>	155
	<u>Alphabetisches Verzeichnis allgemeiner Abkürzungen</u>	163
	Abkürzungen von Basen und Nukleotiden.....	164
	Abkürzungen von Aminosäuren bzw. Aminosäureresten.....	164
	<u>Anhang: Detaildarstellung zu den Plasmidkonstruktionen</u>	165
	<u>Lebenslauf</u>	174

Vorbemerkung

1. Bezeichnung von Mutanten und Mutagenese-Oligonukleotiden

Aufgrund einer bisher fehlenden internationalen Übereinkunft wurde eine eigene Nomenklatur bei der Benennung von Protein-Mutanten und Mutagenese-Oligonukleotiden gewählt. Diese folgt den unten beschriebenen Regeln:

(i) Bei der Mutantenbezeichnung wird die Wildtyp-Aminosäure und die veränderte Aminosäure (jeweils im Einbuchstaben-Code) angegeben. Die dazwischen im Index stehende Zahl bezeichnet die Position des Austauschs in der Kette. Ein Beispiel: Beim Austausch der Aminosäure Alanin gegen Glycin an Position 50 würde die entsprechende Protein-Mutante A₅₀G genannt werden.

Bei Insertion einer Aminosäure wird die Position in der Kette, nach der die Insertion erfolgt, im Index angegeben und die neu entstandene Position mit dem Buchstaben "a" gekennzeichnet; z.B. hieße eine Mutante mit einem inserierten Glycinrest nach Position 50 G_{50a}.

(ii) Die Namensgebung der zur Mutagenese verwendeten Oligonukleotide berücksichtigt die Molekül-Länge, die ursprünglichen (=Wildtyp-) und die im Gen zum Austausch führenden Basen sowie die Austauschposition(en) im Gen. Dabei hat die erste Base des Startcodons die Nummer 1. Um eine einheitliche Benennung zu erreichen, wird immer auf den Basenaustausch im kodierenden Strang Bezug genommen, unabhängig davon, ob das Oligonukleotid tatsächlich dieser Sequenz entspricht oder aus methodischen Gründen entsprechend dem Gegenstrang synthetisiert worden war.

Ein Beispiel veranschaulicht den Sachverhalt: Ein Oligonukleotid von 25 Basen Länge, welches im Sinn-Strang eines Gens an den Genpositionen 100 und 101 zum Austausch von zwei Guanin-Basen gegen zwei Cytosine führen soll, würde die Bezeichnung O₂₅-GG_{100,101}CC tragen.

Wenn nicht ein Austausch, sondern eine Insertion von zusätzlichen Basen an einer bestimmten Position vorliegt, wird neben der Nukleotidlänge nur die Position, nach der die Einfügung erfolgt, sowie die Art der eingefügten Basen genannt; z.B.: O₂₅-ins₁₀₀AAA.



2. Kurzausdrücke zur Umschreibung komplexerer Sachverhalte

Zur vereinfachten Beschreibung komplexerer Sachverhalte werden in dieser Arbeit die folgenden Kurzausdrücke verwendet:

"Mutein": Mutiertes Protein mit definierter Veränderung in der Aminosäuresequenz

"Thermophiles" Protein/Enzym: Enzym oder Protein, das den Anforderungen der Zelle für das Wachstum bei hohen Temperaturen gerecht wird.

Restriktions"verdau" einer DNS: Enzymatische Spaltung einer doppelsträngigen DNS mit einer Restriktionsendonuklease.

"Verdau" (oder "Abdauen") durch Exonukleasen: Sequentielle Entfernung von Basen an den Strang-Enden einer DNS (oder RNS).

"Klenow-Polymerase": Großes (=Klenow-) Fragment der DNS-Polymerase I von E. coli

"pUC 18/19"; "M13mp18/19"; "pMa/c": Plasmide pUC 18 und/oder pUC 19; Plasmide M13mp18 und/oder M13mp19; Plasmide pMa und/oder pMc.

3. Unterstützende Computerprogramme für Abbildungen und Text

Bei der Erstellung des vorliegenden Textes wurde das Textverarbeitungsprogramm "RESY" der VAX-II-Computeranlage des MPI für Biochemie, Martinsried verwendet. Die Darstellung von umfangreichen Protein- oder DNS-Sequenzen wurde durch die Programme "PUBLISH" (z.B. Abb. 11, Abb. 12) bzw. "LINEUP" (z. B. Abb. 13) aus dem UWGCG-Software-Paket der gleichen Rechenanlage erleichtert.

Die meisten anderen Abbildungen sowie fast alle Tabellen wurden dagegen mit den Zeichenprogrammen "MACDRAW" oder "MACDRAW-II" bzw. mit dem Plot-Programm "CRICKET GRAPH" an einem APPLE-Personal-Computer MACINTOSH PLUS erstellt, der mir freundlicherweise in der Abteilung Prof. Dr. W. Zillig zur Verfügung gestellt wurde.

4. Vorveröffentlichungen

Einige Teile der vorliegenden Arbeit wurden in den unten genannten Artikeln vorveröffentlicht. Da die dort dargestellten Ergebnisse integrale Bestandteile der Arbeit sind, wird auf diese Publikationen ansonsten nicht mehr verwiesen.

1. Fabry, S. und Hensel, R.: Primary structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase deduced from the nucleotide sequence of the thermophilic archaeobacterium Methanothermus fervidus. Gene 64, 189-197 (1988)

2. Fabry, S., Lehmacher, A., Bode, W. und Hensel, R.: Expression of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from the extremely thermophilic archaeobacterium Methanothermus fervidus in E. coli. FEBS Letters 237, 213-217 (1988)

3. Hensel, R., Zwickl, P., Fabry, S., Lang, J. und Palm, P.: Sequence comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from the three kingdoms: evolutionary implication. Can. J. Microbiol. 35, 81-85 (1989)

4. Fabry, S., Lang, J., Niermann, T., Vingron, M. und Hensel, R.: Nucleotide sequence of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from the mesophilic methanogenic archaeobacteria Methanobacterium bryantii and Methanobacterium formicicum. Comparison with the respective gene structure of the closely related extreme thermophile Methanothermus fervidus. Eur. J. Biochem. 179, 405-413 (1989)

Einleitung

Bis Mitte der siebziger Jahre galt es als selbstverständlich, die lebende Welt in zwei große Ur-Reiche einzuteilen: Auf der einen Seite stand das Reich der primitiven Prokaryonten, auf der anderen das fortschrittliche Eukaryontenreich. Als sich Carl Woese durch seine phylogenetischen Untersuchungen auf der Basis eines Sequenzvergleiches der 16S rRNS veranlaßt sah, einen Teil der Prokaryonten in ein drittes, neues, den anderen beiden vollständig gleichberechtigtes Ur-Reich, das Ur-Reich der Archaeobakterien, zu stellen (Woese und Fox, 1977), war dies durchaus eine kleine Revolution.

Seither hat die Faszination, die von diesen Lebewesen ausgeht, eine große Anzahl von Forschergruppen in ihren Bann geschlagen, und das nicht nur aus Interesse an der Phylogenie. Insbesondere rückten die biochemischen Besonderheiten der Archaeobakterien (z.B. ungewöhnliche Stoffwechselleistungen: Methanogenese, Schwefelmetabolismus; neuartige Membranbestandteile: Phytanyletherlipide), bisher als "Sonderfälle" innerhalb der Prokaryonten abgelegt, ins Zentrum des Interesses. Und schließlich hat die Fähigkeit dieser Organismen, teilweise unter "extremen" Lebensbedingungen existieren zu können, eine neue Dimension bei der Betrachtung der Anpassungsmöglichkeiten der lebenden Zelle an ihre Umwelt eröffnet. Dabei sind unter "extremer" Umwelt Biotope verstanden, die sich durch auffallend niedrige pH-Werte (<3), hohe NaCl-Konzentrationen (10% Salzgehalt und mehr) oder Temperaturen um den Siedepunkt auszeichnen. Alle diese Habitats können durch Organismen besiedelt werden, doch sind es gerade die Archaeobakterien, die durch ihre Anpassungsfähigkeit (oder ihre Ursprünglichkeit?) dort noch das einzige Leben bilden (vgl. Herbert und Codd, 1986).

Bei der Frage nach den molekularen Ursachen solcher Anpassungen setzt sich unsere Arbeitsgruppe vor allem mit dem Problem der Thermoadaptation auseinander. Hier sind die Bedingungen nicht nur aus menschlicher Sicht extrem: Die Grenzen für das Leben werden vielmehr durch physikalische Gesetzmäßigkeiten vorgegeben, wenn auch die Diskussion über die tatsächliche Temperatur-Obergrenze des Lebens noch immer offen ist (vgl. z.B. Joyce, 1988). Es erscheint jedoch klar, daß sowohl die Makromoleküle (DNS, Membranen, Proteine) der Zelle, als auch die niedermolekularen

organischen Verbindungen des Stoffwechsels nicht unbegrenzt thermostabil sein können, wobei das Limit für das Leben bereits erreicht ist, wenn ein zentrales Glied dieses Netzwerks ausfällt.

In diesem Zusammenhang stellen die Archaeobakterien eine besondere Herausforderung dar, da man bei ihnen Vertreter finden kann, die nicht nur im Bereich des Siedepunktes (bei 80-100 °C: die "extrem Thermophilen"), sondern auch noch darüber (100-110 °C: die sogenannten "Ultrathermophilen") leben können (vgl. die Übersicht bei Kelly und Deming, 1988). Diese Fähigkeiten erfordern ohne Zweifel einen besonderen Aufbau der zellulären Makromoleküle.

Die Frage nach den molekularen Hintergründen der Thermoadaptation ist dabei auch schon vor der Entdeckung der Archaeobakterien gestellt worden und hat viele Forschergruppen beschäftigt (vgl. Amelunxen und Murdock, 1978a, 1978b; Zuber, 1978; Ljungdahl, 1979). Eine besondere Berücksichtigung fanden die Proteine und Enzyme, die im Rahmen der Anpassung an hohe Temperaturen insofern schon ein spezielles Bauprinzip erfordern, als sie der Hitzedenaturierung entgehen müssen.

Dabei ist die Suche nach Antworten keineswegs nur durch rein akademisches Interesse motiviert. So besteht auf industrieller Seite durchaus Bedarf an Enzymen, die bei erhöhten Temperaturen zu biokatalytischen Umsetzungen fähig sind oder generell eine gesteigerte Stabilität im Rahmen von biochemischen Prozeßführungen aufweisen (vgl. Ng und Kenealy, 1986; Bergquist et al., 1987; Ward und Moo-Young, 1988; Kelly und Deming, 1988). Das bisher wohl überzeugendste Beispiel hierfür liefert die vor wenigen Jahren entwickelte Polymerase-Chain-Reaction (PCR, eine Möglichkeit, DNS-Fragmente in vitro zu vermehren; Saiki et al., 1985). Der durchschlagende Erfolg dieser Methode wurde dabei erst durch die Verfügbarkeit einer thermostabilen DNS-Polymerase ("TAQ-Polymerase" aus dem Eubakterium Thermus aquaticus; Saiki et al., 1988) möglich. Sie erlaubt die kostengünstige Durchführung des Prozesses, da nun nicht mehr nach jeder Amplifikationsrunde (die mit einer vorübergehenden Erhöhung der Inkubations-Temperatur einhergeht) erneut Enzym zugegeben werden muß. Schließlich erhält die Frage nach den Faktoren, die für die Proteinstabilität verantwortlich sind, noch weitere Impulse, seitdem das Spektrum gentechnologischer Möglichkeiten durch neue Verfahren wie gezielte Mutagenese und synthetische Herstellung von Genen den Wunsch nach

"maßgeschneiderten" Enzymen realisierbar erscheinen läßt.

Obwohl es an entsprechender Aktivität nie gemangelt hat, sind konkrete Antworten zum Problem der Thermoadaptation von Proteinen bisher dennoch rar. Die Gründe dafür liegen sicherlich nicht so sehr darin, daß zu wenig Strukturdaten über thermo- und mesophile Proteine zur Verfügung stehen. Doch ist es offensichtlich kaum möglich, mit rein makroskopischen Parametern (Aminosäurezusammensetzung, Hydropathie; vgl. Merkler et al., 1981) oder statistischen Berechnungen (Argos et al., 1979, Argos, 1989) entscheidende Charakteristika des Anpassungsprinzips zu erfassen, wenngleich durch entsprechende Analysen durchaus interessante Hinweise erhalten werden können.

Aber schon die Beobachtung, daß isolierte Enzyme aus thermophilen Organismen oft eine geringere Stabilität aufweisen als erwartet, weist darauf hin, daß man dem Wesen der Thermophilie nur unter Berücksichtigung der verschiedenen Wechselwirkungen in der Zelle gerecht werden kann. So haben Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an cytoplasmatischen Enzymen des extrem thermophilen Archaeobakteriums Methanothermus fervidus ergeben, daß die Stabilitätsgrenze der Proteine in vitro erheblich unter der optimalen Wachstumstemperatur des Organismus liegt (intrinsische Stabilität: maximal 75 °C; optimale Wachstumstemperatur von M. fervidus: 83 °C), jedoch durch Zugabe von Salzen (vor allem durch Kaliumphosphat) in den physiologischen Temperaturbereich angehoben werden kann (Fabry und Hensel, 1987; Hensel und König, 1988). Dies scheint die Bedingungen in vivo insofern widerzuspiegeln, als bei M. fervidus tatsächlich hohe intrazelluläre K^+ -Konzentrationen festgestellt werden konnten, deren Ladung offenbar durch ein ungewöhnliches Gegenion (ein cyclisches 2,3-Diphosphoglycerat) kompensiert wird (Hensel und König, 1988). Zudem scheint bei den thermophilen Methanobacterales eine Abhängigkeit zwischen dem intrazellulären K^+ -Gehalt und der Umgebungstemperatur zu existieren. Möglicherweise paßt sich die Zelle damit an variierende Temperaturbedingungen an (Hensel und König, 1988).

Selbst bei Beschränkung der Betrachtung von Thermoadaptation auf den Aspekt "intrinsische Stabilität" müssen zwei Faktoren Berücksichtigung finden: der Einfluß der Temperatur auf die kovalente Proteinstruktur und der Einfluß auf die Konformation.

In bezug auf den erstgenannten Punkt haben Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Klibanov (Ahern und Klibanov, 1985; Zale und Klibanov, 1986; Ahern et al., 1987; Tomazic und Klibanov, 1988a, 1988b) ergeben, daß bei Temperaturen von 90-100 °C die Polypeptide der Zelle bereits Modifikationen erfahren können, die über reine Konformationsstörungen hinaus gehen. Bei der Analyse des Hitzeeinflusses auf verschiedene Enzymsysteme wurde festgestellt, daß an Cystinresten β -Elimination auftreten kann, Cysteinreste zu Sulfensäuren oxidiert, Asparagin- und Glutaminreste desamidiert werden, und eine Spaltung der Aminosäurekette nach Asparaginsäureresten erfolgen kann.

Für den zweiten Fall - die Frage nach den Faktoren, die die konformelle Stabilität eines Proteins bedingen - erschienen zunächst die Ansätze vielversprechend, in denen Protein-Homologe von verschiedenen thermo- und mesophilen Organismen verglichen wurden (Perutz und Raidt, 1975: Ferredoxin; Walker et al., 1980: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; Zuber, 1981: L-Laktatdehydrogenase). Bei vielen der genannten Untersuchungen ist die Aussage allerdings insofern eingeschränkt, als auch homologe Proteine aus Organismen mit teilweise erheblicher phylogenetischer Distanz in den Vergleich aufgenommen wurden (z.B. Walker et al., 1980).

Weitere Hinweise auf die Prinzipien konformeller Stabilisierung wurden durch natürliche bzw. nach UV- oder chemischer Behandlung selektierte Protein-Mutanten mit geänderter Thermostabilität erhalten (Yutani et al., 1978: Tryptophan-Synthase; Gruetter et al., 1979: T4-Lysozym; Hecht et al., 1984: Lambda-Repressor; Makino et al., 1989: Glucose-Dehydrogenase). Die bisher klarsten Aussagen konnten schließlich aus der Einführung gezielter Aminosäure-Austausche in strukturell gut beschriebene Moleküle und anschließende detaillierte Analyse der Auswirkungen auf den Proteinphänotyp gewonnen werden (für Beispiele vgl. Shortle, 1989). Demnach spielen solche Austausche, die zu einer Verstärkung der Wasserstoff-Brücken-Bindungen und hydrophoben Wechselwirkungen, zur Erhöhung der Ionenbindungskapazität, oder zu einer Reduktion der Auffaltungsentropie führen, die wichtigste Rolle (Matthews, 1987).

Allerdings wurde die Mutagenese und Mutantenanalyse überwiegend an mesophilen bzw. nur moderat thermophilen Proteinen durchgeführt (z.B. Hecht et al., 1984; Makino et al., 1989; und andere), so daß keine Hinweise auf die Faktoren vorliegen, die eine Anpassung an extrem hohe

Temperaturbereiche erlauben. Zudem wurde entsprechende Funktionsuntersuchungen dabei gewöhnlich nicht beachtet. Die Thermophilie der Zelle fordert jedoch von den Enzymen neben ausreichender Stabilität katalytische Eigenschaften, die sie in die Lage versetzen, bei hohen Temperaturen einen funktionierenden Stoffwechsel aufrechtzuerhalten.

Auch wir versuchten bei der Frage nach den strukturellen Grundlagen der Protein-Thermoadaptation zunächst über einen Vergleich thermophiler Proteine mit mesophilen Homologen erste Hinweise auf die Prinzipien der Thermophilie zu erhalten, um dann durch gezielte Mutagenese die Thermophilie-spezifischen Merkmale näher einzugrenzen. Durch die Verwendung von Archaeobakterien (und speziell der Methanogenen) als Modellsystem bietet sich uns aber eine besonders günstige Ausgangsbasis, da einige Vertreter bei extrem hohen Temperaturen leben, aber andererseits auch sehr nahe verwandte Mesophile (Wachstum bei 37 °C) existieren. Somit besteht hier eine Möglichkeit zu vergleichenden Struktur-Funktionsanalysen der Makromoleküle von Lebewesen, die sich durch große Unterschiede ihrer Wachstumsoptima auszeichnen und deshalb die strukturellen Anpassungen an das Temperaturmilieu besonders deutlich machen sollten, ohne dabei den Vergleich durch zu große phylogenetische Distanzen zu erschweren.

Um unsere Aussagen zu den strukturellen Faktoren der Thermoadaptation auf eine möglichst breite Basis stellen zu können, wurden drei Enzymsysteme gewählt: Die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), die Malat-Dehydrogenase (MDH) und die 3-Phosphoglycerat-Kinase (PGK). Diese Enzyme wurden auch schon bei Eubakterien und Eukaryonten hinreichend beschrieben und katalysieren zentrale Reaktionen im Stoffwechsel, so daß sich ein breites Vergleichs-Spektrum bietet.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zunächst eine Basis für die angestrebten gentechnologischen Untersuchungen an diesen Enzymen zu schaffen. Ausgehend von der in früheren Arbeiten (S. Fabry, Diplomarbeit 1986, Fabry und Hensel, 1987) enzymatisch und biochemisch bereits gut charakterisierten GAPDH aus dem extrem thermophilen Archaeobakterium M. fervidus konnte die Struktur dieses Enzyms durch Isolierung und Sequenzierung des Gens bestimmt werden. Auf die gleiche Weise wurde auch die Primärstruktur der M. fervidus-PGK aufgeklärt. Mit der Errichtung

eines Expressionssystems für die M. fervidus-GAPDH und die M. fervidus-MDH in E. coli konnte dann die Voraussetzung für gezielte Veränderungen an den beiden Proteinen geschaffen werden. Durch die in der Parallelarbeit von Jutta Biro aufgeklärten GAPDH-Sequenzen von zwei mesophilen Archaeobakterien (Methanobacterium bryantii, Methanobacterium formicicum; J. Biro, Dissertation, 1989) bot sich zudem an, mit einem Vergleich von thermo- und mesophilen Enzymhomologen Anhaltspunkte für spezifische Strukturmerkmale der Thermophilie zu erhalten. Danach wurde mit Hilfe einiger gezielter Aminosäureaustausche an der M. fervidus-GAPDH geprüft, inwieweit die gefundenen Unterschiede im Zusammenhang mit der strukturellen Thermoadaptation gesehen werden können.

Und wenngleich zunächst Strukturanalysen unter dem Aspekt der Thermoadaptation im Vordergrund standen, war es schließlich auch naheliegend, die Information aus den mit dieser Arbeit neu beschriebenen Proteinsequenzen für phylogenetische Betrachtungen zu nutzen.

Material und Methoden

1. Materialien

1.1 Bakterienstämme

1.1.1 *Methanothermus fervidus*

Methanothermus fervidus Stamm V 24 S (=DSM 2088) (Stetter et al., 1981) wurde von Prof. Dr. K.O. Stetter (Universität Regensburg) in 300-Liter Fermentern (BIOENGINEERING) unter autotrophen Bedingungen angezogen und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

1.1.2 *Escherichia coli*

Für die meisten Klonierungsarbeiten sowie für die Doppelstrangsequenzierung mit Hilfe von pUC-Plasmiden wurde der E. coli K12-Stamm JM 83 (ara; $\Delta(\text{lac-proAB})$; strA; thi; $\phi 80d\text{lacZ}\Delta\text{M15}$) (Messing, 1979) eingesetzt. Bei der Einzelstrangsequenzierung des M. fervidus-pgk-Gens mit Hilfe rekombinierter M13mp18/19-Phagen war der Wirt E. coli DH5 α (F^- ; endA1; hsdR17(r_k^- , m_k^+); supE44; thi-1; λ^- ; recA1; gyrA96; relA1; $\Delta(\text{lacZYA-argF})\text{U169}$; $\phi 80d\text{lacZ}\Delta\text{M15}$) (Jessee, 1986).

Bei den Mutagenese-Experimenten fanden E. coli WK6 ($\Delta(\text{lac-proAB})$; galE; strA; $F' \text{lacI}^Q, \Delta\text{M15, proA}^+ \text{B}^+$) und E. coli WK6mutS ($\Delta(\text{lac-proAB})$; galE; strA; mutS215::Tn 10; $F' \text{lacI}^Q, \Delta\text{M15, proA}^+ \text{B}^+$) (Fritz et al., 1988) Verwendung. Diese beiden Stämme wurden mir von Prof. Dr. H.-J. Fritz (Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt.

1.2 Phagen und Plasmide

Die aus dem Phagen M13 (Hofschneider, 1963) für die DNS-Sequenzierung modifizierten Derivate M13mp18 und M13mp19 (Norlander et al., 1983) wurden bei der Sequenzierung des M. fervidus-pgk-Gens eingesetzt. Der Helferphage zur Gewinnung einzelsträngiger pMa/c-Plasmidderivate (s.u.) war M13K07 (Vieira und Messing, 1987; zur Verfügung gestellt von Prof.

Dr. H.-J. Fritz).

Als Klonierungs- und Sequenzierungsvektoren wurden pUC 18 und pUC 19 (Norrand et al., 1983; s. auch Abb. 1, S. 24) verwendet. Zur heterologen Expression archaebakterieller Gene in E. coli diente der Vektor pJF118EH (Fürste et al., 1986; zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. A. Böck, Universität München; vgl. Abb. 5, S. 40). Die Experimente zur gezielten Mutagenese wurden mit dem pMa/c-Plasmidsystem (entwickelt und zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. H.-J. Fritz; nicht publiziert; vgl. Abb. 3, S. 33) durchgeführt.

1.3 Enzyme

Die eingesetzten Restriktionsendonukleasen und DNS-modifizierenden Enzyme wurden mit Ausnahme des Restriktionsenzym Bsm I von SERVA (Heidelberg) entweder von BOEHRINGER (Mannheim) oder von GIBCO/BRL (Eggenstein) bezogen. Auch die Phosphoglycerat-Kinase aus Hefe stammte von BOEHRINGER. Gereinigte GAPDH von M. bryantii wurde mir von Frau J. Biro aus unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

1.4 Chemikalien

Herkunft der im Zusammenhang mit gentechnologischen Methoden verwendeten Substanzen:

- radioaktive Desoxynukleotide: AMERSHAM BUCHLER GmbH (Braunschweig)
- Desoxy- und Didesoxy-Nukleotide: BOEHRINGER (Mannheim)
- Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG): BIOMOL (Ilvesheim)
- 5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -Galaktopyranosid (X-Gal): BIOMOL
- Ethidiumbromid: SIGMA (München)
- Agarose ultrapur: GIBCO/BRL (Eggenstein)
- Harnstoff ultrapur: GIBCO/BRL
- Acrylamid (2x kristallisiert), 1,3-Bisacrylamid: SERVA (Heidelberg)
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris): RIEDEL-DE-HAEN (Seelze)
- verflüssigtes Phenol: RIEDEL-DE-HAEN
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA): SERVA

- Komponenten für flüssige und feste E. coli-Medien: DIFCO (Detroit, USA)
- Tetracyclin, Chloramphenicol: BOEHRINGER
- Ampicillin, Spectinomycin: SIGMA
- N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TMED): SERVA
- γ -(Methacryloxy)-Propyltrimethoxysilan: SIGMA
- Nucleogen-Ionenaustauschersäulen DEAE-4000 (6x125 und 10x125): DIAGEN (Düsseldorf)
- NACS Ionenaustauschersäulen: BETHESDA RESEARCH LABORATORIES (Gaithersburg, USA)
- QUIAGEN-Ionenaustauscher-Material: DIAGEN
- Geneclean-Kit: BIO 101 Inc. (La Jolla, USA)
- Sequenase DNS-Sequenzierkit: USB (Cleveland, USA)
- Nitrozellulose-Filter: SCHLEICHER und SCHÜLL (Dassel)
- Röntgenfilme "X-RAY 90" (20 x 96 cm) zur Autoradiographie von Sequenziergelen: LINHARTD (München)
- Röntgenfilme "TRIMAX" 6639-B-4 (20 x 40 cm) zur Autoradiographie von Filterhybridisierungen: 3M (USA)
- Rinderserumalbumin und Lachssperma-DNS: SIGMA
- Lambda-Phagen-DNS: GIBCO/BRL

Herkunft der im Zusammenhang mit enzymatischen und proteinchemischen Methoden verwendeten Substanzen:

- NAD^+ , NADH , NADP^+ , NADPH : BOEHRINGER
- DL-Glycerinaldehyd-3-phosphat (Monobariumsalz): SIGMA
- 3-Phosphoglycerinsäure (Dinatriumsalz): SIGMA
- Oxalacetat (freie Säure): SIGMA
- DOWEX 50W Ionenaustauscherharz: SIGMA
- Dextranblau-Sepharose (Blue Sepharose CL-6B): PHARMACIA (Uppsala, Schweden)
- Matrex Red A Gel: AMICON (Witten)
- Aminohexylsepharose: SIGMA
- ATP (Dinatriumsalz): BOEHRINGER
- K-Arsenat: SIGMA
- Coomassie-Brillant-Blue R 250: SERVA

Alle sonst verwendeten Reagenzien und Lösungen wurden in höchstmöglicher Reinheit von MERCK (Darmstadt) bezogen.

Hydroxylapatit wurde nach Levin (1962) selbst hergestellt.

Der GAPDH-Inhibitor Pentalenolakton (Mann und Mecke, 1979) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. D. Mecke (Universität Tübingen) als methanolische Lösung (2 mg/ml) zur Verfügung gestellt.

1.5 Geräte

Zentrifugen:

Ultrazentrifuge (Modell L5-50): BECKMAN

Großzentrifugen (J2-21 und J-21B): BECKMAN

Großzentrifuge (G 50 K): WKF

Minifuge: HERAEUS CHRIST

Tischzentrifugen (Typ 5415 und 5412): EPPENDORF

HPLC-Anlage:

Pumpensystem, elektronischer Gradientenmischer und Photodetektor: KRATOS

Automatischer Probengeber: WATERS

Zweikanalschreiber: LAUMANN

Photometer:

UV-Spektrophotometer (Typ 250): GILFORD

Filter-Photometer mit Kompensationsschreiber: EPPENDORF

Elektrophoresesystem zur DNS-Sequenzierung:

Elektrophoreseeinheit "Macrophor 2010", Stromgeber "Macrodrive 5" und thermostatisierbare Rückplatte: LKB

Die Inkubations-Wasserbäder sowie die Anlagen für Agarosegel-Elektrophorese waren größtenteils Eigenbau der Abteilung Prof. Dr. W. Zillig (MPI für Biochemie, Martinsried). Für die Bakterien- und Phagenzucht stand ein auf 37 °C temperierter Brutraum zur Verfügung.

2. Methoden

2.1 Arbeiten mit DNS

2.1.1 Grundlegende gentechnologische Verfahren

2.1.1.1 Anzucht und Aufbewahrung von Bakterien- und Phagenkulturen

E. coli-Kulturen wurden in Vollmedium (5g Hefeextrakt + 5g Pepton oder Trypton + 5 g NaCl pro 1 Liter H₂O dest; pH eingestellt auf 7,3) oder Minimalmedium (entspr. M9-Medium nach Maniatis et al. (1982) unter Fortlassung von NaCl, aber zusätzlicher Gabe von 5 ml 100 µM FeCl₃ und 1 µg Thiamin pro Liter) bei 37 °C gezogen. Antibiotika wurden nach Erfordernis in folgender Menge (pro 1 Liter Medium) eingesetzt:

Ampicillin: 100 µg

Chloramphenicol: 25 µg

Tetracyclin: 20 µg

Kanamycin: 75 µg

Spectinomycin: 300 µg

Für feste Nährböden wurden vor dem Autoklavieren pro Liter Medium 13 g Agar zugefügt.

Von allen wichtigen E. coli-Stämmen und -Klonen wurden Glycerinkulturen (Suspension von Zellpellets aus 1 ml Nährlösung in 0,5 ml 45% Glycerin) hergestellt und bei -80 °C aufbewahrt.

M13K07 Helferphagen-Stammkulturen wurden nach dem von Prof. Dr. H.-J. Fritz (pers. Mitteilung) vorgeschlagenen Verfahren angelegt: 7,5 ml Übernachtskultur von E. coli WK6 (in Minimalmedium) wurden 1:4 mit frischem Kanamycin- Vollmedium verdünnt, mit 200 µl M13K07 (Titer = 2×10^{11} Phagen pro ml) beimpft und 5-7 h bei 37 °C geschüttelt. Je 1 ml der Kultur wurde in einem sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß 5 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Dieser Prozess wurde zweimal wiederholt, um einen garantiert zellfreien Überstand zu erhalten. Der Phagentiter wurde durch Auszählen der Plaques in E. coli WK6 Zellrasen nach Infektion mit verschiedenen Phagenverdünnungen ermittelt. Die Phagenstammlösung (um 2 x

10^{11} Infektionseinheiten/ml) konnte bei 4 °C oder eingefroren aufbewahrt werden.

Zur Gewinnung von M13mp18/19-Phagenderivaten wurden die aus der replikativen Phase der Phagenvermehrung gewonnenen M13mp18/19-Doppelstrangplasmide mit Fremd-DNS rekombiniert und in E. coli DH5 α transformiert. Von den in einem Zellrasen von DH5 α gebildeten Plaques (s. 2.1.1.12, (b)) wurden die Phagen zur Weitervermehrung mit einem sterilen Zahnstocher in 1,5 ml 1:100 verdünnte DH5 α -Übernachtskultur übertragen und 12-16 h bei 37 °C geschüttelt. Aus dem nach Zentrifugation erhaltenen zellfreien Überstand (s.o.) wurden 200 μ l abgenommen und eingefroren. Diese Stammkultur konnte bei Bedarf zur Neugewinnung von Phagen verwendet werden.

2.1.1.2 Gewinnung von chromosomaler DNS

Langkettige chromosomale DNS von M. fervidus wurde nach Zellaufschluß (French Press; einmalige Passage bei 800 atm) nach der von Marmur (1961) beschriebenen Methode (wiederholtes Ausschütteln der Proteine mit Phenol und Chloroform, Ethanol-fällung und Aufwickeln der Nukleinsäuren sowie deren Behandlung mit RNasen) gewonnen. Die Konzentration der DNS wurde photometrisch bestimmt, die Homogenität der Präparation durch Agarose-Gelelektrophorese geprüft. Aufbewahrung erfolgte in TE-Puffer pH 8,0 bei 4 °C.

2.1.1.3 Rohpräparation von doppelsträngigen Plasmiden

Die hier angewendeten Verfahren wechselten je nach Art des Vektors und dem erforderlichen Mengenbedarf. Zudem ersetzten während des Verlaufes der Arbeit neu bekannt gewordene Methoden ältere, sofern sie deren Effizienz übertrafen. Im folgenden werden nur die bewährten Verfahren genannt.

(a) Plasmidminipräparation

Für die DNS-Präparation aus 1-1,5 ml E. coli-Übernachtskulturen wurde das Verfahren nach Ish-Horowicz und Burke (1981) durchgeführt. Eine

längere Aufbewahrung der so gewonnenen Plasmide empfahl sich wegen der offensichtlichen Anwesenheit von DNasen in der Präparation nur im gefällten oder eingefrorenen Zustand.

(b) Plasmidpräparation nach alkalischer Lyse

Plasmide mit hoher Kopienzahl (pUC18/19 und seine Derivate) wurden aus 30 ml E. coli-Kulturen ebenfalls nach der Präparationsmethode von Ish-Horowicz und Burke (1981) gewonnen. Alle Mengenangaben der Originalvorschrift wurden, dem größeren Ausgangsvolumen entsprechend, mit dem Faktor 30 multipliziert. Die Aufarbeitungsschritte erfolgten hier in 30-ml Plastikröhrchen für den JA-20 Rotor der BECKMAN-J-21-Zentrifuge. Dabei fand die Pelletierung der Zellen aus der Flüssigkultur bei 8000 UpM (10 min) statt; Protein- und DNS-Fällung erfolgten jeweils bei 20000 UpM (20 min).

(c) Plasmidpräparation nach Zell-Lyse mit Hilfe einer Detergenzienmischung

Die Zell-Lyse wurde nach der Vorschrift von Clewell und Helinski (1969) durchgeführt, wobei das Ausgangsmaterial aber aus 1 Liter E. coli-Kultur gewonnen wurde. Dementsprechend wurde das Volumen der entsprechenden Lösungen im Vergleich zur Originalvorschrift um den Faktor 10 erhöht. Die Methode wurde aufgrund des höheren Zeitaufwandes nur für Plasmide mit niedriger Kopienzahl (pMa/c-Plasmide, pJF118EH, mit Spectinomycin amplifiziert) eingesetzt, zu deren Gewinnung größere Zellmengen erforderlich waren. Der Vorteil des Verfahrens bestand darin, daß eine im Vergleich zur alkalischen Lyse deutlich geringere RNS-Kontamination der Lösung ("cleared lysate") vorlag, wodurch bei der anschließenden chromatographischen Endreinigung (s.u.) eine höhere Plasmid-Ausbeute erzielt werden konnte.

2.1.1.4 Chromatographische Reinigung von Plasmidrohpräparaten

(a) Reinigung mit Hilfe der HPLC-Anlage

Für die Gewinnung hochreiner, sequenzierbarer Doppelstrang-Plasmide

wurde eine Plasmid-Rohpräparation in 400 μ l TE Puffer pH 8,0 aufgenommen, einmal mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform (1:1) ausgeschüttelt, mit Ethanol neu gefällt, in nicht mehr als 200 μ l TE Puffer pH 8,0 + 2 μ g RNase A aufgenommen und 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die chromatographische Nachreinigung über eine NUCLEOGEN Ionenaustauschersäule DEAE 4000 mit Hilfe der HPLC. Entsprechend der Vorschrift des Säulenherstellers wurde die chromatographische Trennung mit einem KCl-Gradienten von 0,45-0,97 M (Grundpuffer: 20 mM Na-Phosphat, 5 M Harnstoff, pH 6,9; Laufzeit des Gradienten: 30 min; Flußgeschwindigkeit: 2 ml/min) durchgeführt. Dabei eluierte die reine Plasmid-DNS bei 0,9 M KCl. Sie wurde durch Zugabe von PEG 6000 (Endkonzentration 10% w/v) über Nacht bei 4 °C gefällt, zentrifugiert, mit 1 ml 75%-igem Ethanol nachgewaschen, getrocknet und in 200 μ l TE pH 8,0 aufgenommen. Die Qualität des Materials wurde durch Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Konzentrationsbestimmung und Aufbewahrung erfolgten wie für die chromosomale DNS angegeben (s. 2.1.1.2).

(b) Plasmidreinigung mit QUIAGEN-Ionenaustauschermaterial

Plasmide mit ausreichendem Reinheitsgrad für Restriktionsanalysen oder Subfragmentisierungen konnten durch ein erheblich schnelleres Nachreinigungsverfahren mit Hilfe von QUIAGEN-Ionenaustauscher-Minisäulen gewonnen werden, wobei zwar Proteine vollständig entfernt wurden, aber eine schwache RNS-Kontamination verblieb. Das vom Hersteller empfohlene Vorgehen wurde leicht modifiziert: DNS-Rohmaterial wurde wie unter (a) mit Phenol/Chloroform behandelt und gefällt, dann aber in 250 μ l H₂O dest. aufgenommen und mit 40 μ l 5 M NaCl sowie 10 μ l 500 mM MOPS pH 7,0 versetzt. 2 μ g RNase A wurden zugegeben. Nach 15 min Inkubation bei 37 °C wurde die Lösung auf eine mit 400 mM NaCl, 15%-igem Ethanol und 50 mM MOPS pH 7,0 äquilibrierte QUIAGEN-Säule Typ "TIP 20" aufgebracht. Durch viermaliges Durchspülen der Lösung durch die Säule wurden die Plasmide an das Ionenaustauschermaterial adsorbiert. Mitadsorbiertes Material (RNS, Proteine) konnte durch dreimaliges Nachspülen mit je 300 μ l 1 M NaCl, 15%-igem Ethanol und 50 mM MOPS pH 7,0 zum größten Teil entfernt werden. Danach wurden die Plasmide mit 400 μ l 1,5 M NaCl, 15%-igem Ethanol und 50 mM MOPS pH 7,5 eluiert. Nach Fällung mit 1 Volumen Isopropanol (30 min im Eisbad), Zentrifugation (20 min), Waschen (1 ml 75%-iger Ethanol),

Trocknen, Aufnahme in TE pH 8,0 und Qualitätskontrolle durch Gelelektrophorese empfahl sich aufgrund des geringeren Reinheitsgrades eine Aufbewahrung bei -20°C .

2.1.1.5 Gewinnung von einzelsträngigen Plasmiden

(a) Einzelsträngige M13mp18/19-Derivate

Die Präparation erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift des "M13 Cloning and Sequencing Handbook" (AMERSHAM INTERNAT. Plc., Amersham, UK). Allerdings wurde nicht 1 ml, sondern 1,2 ml zellfreier Kulturüberstand zum Sedimentieren der Phagen eingesetzt. Die dafür verwendete Phagen-präzipitationslösung (300 μl) bestand aus 20% (w/v) PEG 6000 und 2,5 M NaCl. Vor der Zentrifugation bewährte sich eine 15-minütige Vorinkubation in Eis. Zur Entfernung der Proteine wurde das in 200 μl TE pH 8,0 resuspendierte Phagenpellet je 10 min in Gegenwart von 1 Volumen Phenol und anschließend 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) geschüttelt. Die Einzelstrang-DNS wurde nach Zugabe von 1/10 Volumen 5 M Na-Perchlorat und 1 Volumen Isopropanol zur wässrigen Phase durch 20 minütige Zentrifugation bei 4°C , vollständiges Abziehen des Überstandes, Trocknen und Lösen des Pellets in 20 μl H_2O bidest. gewonnen.

(b) Einzelsträngige pMa/c-Derivate

Der Plus-Strang von Plasmiden des pMa/c-Systems konnte durch in vivo-Verpackung in Gegenwart des nicht-lytischen Helferphagen M13K07 als einzelsträngiges DNS-Molekül gewonnen werden. Man erhält dabei im Kulturüberstand eine gemischte Phagen-Population, wobei der Anteil der pMa/c-Derivat-tragenden Phagen den der Original-Phagen aufgrund der höheren Spezifität des Verpackungssystems für das Plasmid um das etwa 10-50-fache übertrifft (H.-J. Fritz, pers. Mitteilung). Für die Zucht wurde eine Übernachtskultur von E. coli-pMa/c-Transformanten 1:50 mit frischem, Antibiotikum-freiem Medium verdünnt und bei 37°C bis zu einer $\text{OD}_{578} = 0,1$ angezogen. Nach Zugabe von 10 μl M13K07-Stammlösung (2×10^{11} Phagen/ml) wurde Kanamycin (75 $\mu\text{g/ml}$) zugegeben. Dies erlaubte nur noch infizierten Zellen das Weiterwachstum, da der Phage das entsprechende Resistenzgen besitzt. Nach Inkubation der Kultur über Nacht bei 37°C

unter starker Agitation erfolgte die Gewinnung der DNS-Einzelstränge analog zu M13mp18/19 (s.o.). Eine Abtrennung der mitisolierten M13K07-DNS vom jeweiligen pMa/c-Derivat war für die hier gewünschte Weiterverwendung (Mutagenese, Sequenzierung) nicht erforderlich.

2.1.1.6 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau erfolgte in den meisten Fällen in einem Reaktionsvolumen von 20 μ l unter den von den Lieferungsfirmen der Enzyme empfohlenen Bedingungen. Während zu Beginn der Arbeit die Pufferbedingungen noch nach dem von Maniatis et al. (1982) vorgeschlagenen System (Low-, Medium- und High-salt-Puffer) eingestellt wurden, fanden später die neuerdings von den entsprechenden Firmen zum Enzym mitgelieferten Spezialpuffer Verwendung. Nur bei Mehrfachverdauen mit Enzymen, die unterschiedliche Pufferanforderungen stellten, wurde - falls möglich - gelegentlich auf das alte System zurückgegriffen. Um vollständige Schnitte zu erzielen, empfahl es sich, bei 1 h Verdauzeit mindestens 4 U Enzym pro 1 μ g DNS einzusetzen. Bei Verwendung von RNS-kontaminierter DNS mußte dem Ansatz abgekochte (DNase-freie) RNase A beigelegt werden (Richtwert 50-200 ng/ μ g DNS).

2.1.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNS in horizontalen Agarosegelen erfolgte nach Maniatis et al. (1982). Die Agarosekonzentration betrug 0,8-1%. Der Kammerpuffer setzte sich wie folgt zusammen: 40 mM Tris/Acetat pH 8,0 + 5 mM Na-Acetat + 1 mM EDTA. Je nach Größe der Gele (Minigele: 20 ml Gelvolumen, Maxigele: 100-200 ml Gelvolumen) und erwünschter Auflösung erforderte die elektrophoretische Trennung bei einer angelegten Spannung von 120 V 30 min bis 5 h. Die DNS wurde nach 10 minütiger Inkubation der Gele in 0,04%-iger wässriger Ethidiumbromidlösung unter UV-Licht sichtbar gemacht.

2.1.1.8 Größenbestimmung von DNS-Restriktionsfragmenten

Die Länge von DNS-Fragmenten wurde durch Agarosegel-Elektrophorese in Gegenwart eines Längenstandards (Hind III-geschnittene DNS des Lamb-

da-Phagen) ermittelt. Die Berechnung der Fragmentgrößen erfolgte dabei unter Verwendung eines vom Rechenzentrum des MPI für den VAX-II-Rechner zur Verfügung gestellten FORTRAN-Computerprogramms.

2.1.1.9 Gewinnung von DNS-Restriktionsfragmenten aus Agarosegelen

(a) Fragmentpräparation durch Ionenaustauschersäulen

Aus dem Gel ausgeschnittene Agaroseblöckchen mit dem gewünschten DNS-Fragment wurden schonend homogenisiert, indem sie einmal langsam durch eine von der Nadel befreite Spritzenkanüle gepreßt und sodann 10 min bei -80°C eingefroren und sofort wieder aufgetaut wurden. Das Homogenat wurde dann in 1-2 ml Low-salt-Puffer (TE pH 7,5 + 0,2 M NaCl) aufgenommen und in eine schmale Glassäule gefüllt, an deren unterem Ende eine mit Low-salt-Puffer äquilibrierte NACS-Ionenaustauschersäule befestigt war. Die Auswaschung der DNS aus dem Homogenat und ihre Adsorption an die Säule erfolgte durch konstante Spülung mit ca. 1 Liter Low-salt-Puffer über Nacht. Elution und Fällung der DNS wurden nach Vorschrift des Säulenherstellers vorgenommen.

(b) Fragmentpräparation mit Hilfe des GENE-CLEAN-Kits

Nach Erscheinen des GENE-CLEAN-Kits auf dem Markt löste dieses schnelle System das zeitaufwendige NACS-Verfahren ab. Es wurde nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Für schnelleres Aufschmelzen des Agaroseblöckchens sowie für eine quantitative Desorption der DNS von der Glasmilch wurde dabei eine Inkubation bei jeweils 56°C gewählt.

2.1.1.10 DNS-Ligation

Für die Ligation von DNS-Fragmenten mit kohäsiven Enden wurde der im "M13 Cloning and Sequencing Handbook" (AMERSHAM INTERNAT. Plc., Amersham, UK) angegebene Ligationspuffer verwendet, für die Ligation von stumpfen Enden der "Blunt-end-Ligationbuffer" nach Maniatis et al. (1982). Das Verhältnis zwischen Vektor und Fragment betrug im allgemeinen 1:5 (w/w). Falls Selbstligation des Vektors durch Vorliegen zweier inkompatibler Schnittenden ausgeschlossen war, konnte der Vektor-Anteil auch erhöht

werden (Vektor/Fragment-Verhältnis: 1:1).

Die sonstigen Ligationsbedingungen (Temperatur, Zeit, Ligasekonzentration) entsprachen den in Maniatis et al. (1982) angegebenen. Beim einfachen Rückligieren von Vektoren oder vektorhaltigen Fragmenten konnte eine ausreichende Religationsrate aber auch schon nach 1 h Inkubation bei 30 °C in Gegenwart von 2 U Ligase pro Ansatz (50-100 ng DNS) erreicht werden.

2.1.1.11 Modifikation überstehender DNS-Einzelstrang-Enden

Die Behandlung freier Einzelstrang-Enden von doppelsträngigen DNS-Fragmenten wurde in enger Anlehnung an Maniatis et al. (1982) vorgenommen.

5'-überstehende Einzelstrang-Enden (wie sie z.B. nach Eco RI-Restriktionsverdau entstehen) wurden mit dem Klenow-Fragment der E. coli-DNA-Polymerase I aufgefüllt, wobei folgender Inkubationsansatz (mit ca. 500 ng DNS) vorlag: 2 µl 10 x Nicktranslationspuffer, 1 µl Desoxynukleotid-Mischung (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, jeweils 0,25 mM), 15 µl H₂O bidest. und 2 µl Klenow-Polymerase (0,2 U/µl). Nach 30 min bei 37 °C wurde das Enzym 5 min bei 70 °C inaktiviert und die DNS mit 40 µl Ethanol gefällt.

3'-überstehende Einzelstrang-Enden (entstehen z.B. nach Pst I-Schnitt) wurden unter Ausnutzung der Exonuklease-Aktivität von T4-DNA-Polymerase abgedaut. Dabei wurden 500 ng DNS, 2 µl T4-Polymerase-Puffer, 16 µl H₂O bidest., 1 µl T4-Polymerase (1U/µl) und 1 µl dNTP in den Ansatz gegeben. Für die Wahl des dNTP war entscheidend, welches der Nukleotide als erstes im Doppelstrang erscheint (beim Pst I-Schnitt wäre dies z.B. dCTP). Durch die Zugabe dieses Nukleotids kann verhindert werden, daß der Doppelstrang anverdaut wird.

Nach 5 min Inkubation bei 37 °C wurde die Polymerase bei 70 °C 5 min inaktiviert. Die DNS wurde anschließend mit Ethanol gefällt.

2.1.1.12 Plasmidtransformation

Kompetente Zellen von allen E. coli -Stämmen wurden durch CaCl₂-Inkubation erzeugt. Dazu wurden 200 ml-Kulturen bei einer OD₅₇₈=0,5 abzentrifugiert, einmal mit 150 ml 100 mM kaltem MgCl₂ gewaschen, in 150 ml 50 mM CaCl₂ resuspendiert und dann 40 Minuten ins Eisbad gestellt.

Nach neuer Zentrifugation wurden die Zellen in 10 ml 50 mM CaCl_2 + 15% Glycerin suspendiert und in 200- μl -Aliquots bei -80°C aufbewahrt.

(a) Transformation von E. coli JM 83, WK6 und WK6mutS

200 μl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 100 μl sterilem H_2O bidest. und der Plasmid-DNS versetzt und 40 min weiter auf Eis gestellt. Nach 3-minütiger Hitzebehandlung (42°C) erfolgte die Regeneration in 2 ml Antibiotikum-freiem Vollmedium (40 min bei 37°C). Danach konnten die Zellen, portioniert je nach zu erwartender Transformantenzahl, auf entsprechende Selektionsplatten ausgebracht und über Nacht bei 37°C zu sichtbaren Kolonien herangezogen werden.

(b) Transformation von E. coli DH5 α

Je 200 μl auf Eis aufgetaute, mit 100 μl sterilem H_2O bidest. versetzte kompetente Zellen wurden in ein steriles 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt und dort mit 1/3 bzw. 2/3 eines Ligationsansatzes 40 min bei 0°C inkubiert. Nach dem Hitzeschock (3 min, 42°C) wurden 40 μl IPTG (24 mg/ml wässrige Lösung), 40 μl X-Gal (20 mg/ml Lösung in Formamid) sowie 200 μl frisch gezogene, nichtinfizierte E. coli DH5 α zugemischt. Nach 1 min weiterer Inkubation bei 42°C und anschließendem Zusetzen von 3 ml 42°C warmem, flüssigem Top-Agar (12 g Trypton, 8 g NaCl, 8 g Agar pro Liter H_2O dest.) wurde der Inhalt des Falcon-Röhrchens auf eine H-Agar-Platte (wie Top-Agar, nur 12 g Agar/Liter) gegossen. Nach Erstarren des Agars erfolgte die Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C bis zur deutlichen Entwicklung des Zellrasens mit den Plaques in der Top-Schicht.

2.1.1.13 Größenselektion partialverdauter DNS-Fragmente durch Dichtegradientenzentrifugation

Zentrifugenröhrchen mit einem Dichtegradienten von 7-30% Saccharose wurden hergestellt, indem je 11 ml einer Lösung aus 18,5% Saccharose (w/v), 100 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA und 20 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid in ein BECKMANN "Ultra-Clear" Zentrifugegefäß (14 x 89 mm) dreimal bei -20°C eingefroren und sodann bei Raumtemperatur

erschütterungsfrei wieder aufgetaut wurden (Baxter-Gabbard, 1972). Pro Röhrchen wurden maximal 50 µg partialverdaute DNS aufgetragen. Anschließend erfolgte eine 20-stündige Zentrifugation (SW-41-Rotor; 25000 Upm; 15 °C). Der fluoreszierende Bereich wurde unter UV-Licht fraktioniert, die Lösung mit 1/10 Volumen 2,5 M Na-Acetat versetzt und die DNS schließlich durch Zugabe von 2 Volumina Ethanol gefällt. Nach Aufnahme in TE pH 8,0, zweimaliger Phenolextraktion und gelelektrophoretischer Kontrolle wurden Fraktionen mit passenden Fragmenten ausgewählt und eingefroren.

2.1.2 Aufbau von Plasmidgenbanken

2.1.2.1 Die verwendete Vektor-Wirt-Kombination

Der Rezipient aller rekombinierter Plasmide war E. coli JM 83. Als Akzeptor für chromosomale DNS-Fragmente wurde Vektor pUC 18 (Abb. 1) gewählt, der für den angestrebten Zweck einige spezifische Vorteile besaß:

- (i) Seine geringe Größe (2686 bp) erlaubt eine hohe Kopienzahl, wodurch sich der Materialaufwand zur Plasmidgewinnung reduziert.
- (ii) Seine Sequenz ist vollständig bekannt, was u. a. Subklonierungsarbeiten und den Einsatz neuer Restriktionsenzyme erleichtert.
- (iii) Durch das Ampicillin-Resistenz-Gen ist einfache Transformations-Selektion möglich.
- (iv) Er besitzt eine MCS in der 13 verschiedene Restriktionsenzyme ihre einzige Schnittstelle haben.
- (v) Die MCS befindet sich im N-terminalen Genabschnitt für das α-Peptid der β-Galaktosidase (lac Z), durch das in geeigneten E. coli-Rezipienten (z.B. JM 83, JM 101) die dort vorliegende Deletion (lac ZΔM15) komplementiert werden kann ("α-Komplementation"). Die komplementierte Aktivität kann durch eine Farbreaktion (Abspaltung des blauen Farbstoffes aus X-Gal) nachgewiesen werden. Durch den mit der Insertion von Fremd-DNS in die MCS einhergehenden Verlust der α-Komplementation lassen sich so Insert-tragende Plasmidtransformanten (weiße Kolonien) leicht von Insert-losen (blaue Kolonien) unterscheiden.

2.1.2.2 Auswahl und Aufbewahrung der Genbank-Klone

Alle mit rekombiniertem pUC 18 transformierten Zellen wurden auf Ampicillin-haltigen Vollmediumplatten in Gegenwart von X-Gal (1 mg/Platte; unmittelbar vor Gebrauch in 50 μ l Formamid gelöst auf die Plattenoberfläche ausgebracht) selektiert.

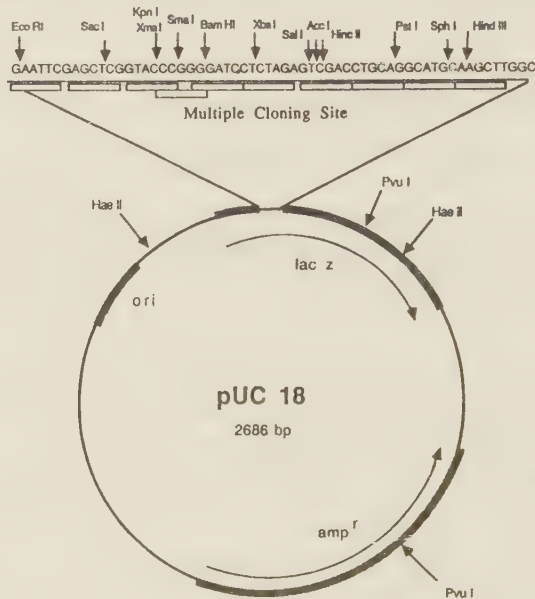


Abb. 1:

Physikalische Karte des Klonierungsvektors pUC 18.

Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die Sequenz der MCS und die Positionen der dort schneidenden Restriktionsenzyme (kleine Pfeile). Mit Boxen unterlegt ist die jeweilige Erkennungsregion für das betreffende Restriktionsenzym. Verdickte Kreisbögen geben die Lage des Gens für das α -Peptid der β -Galaktosidase (*lac z*), des β -Lactamasegens (*amp^r*) sowie des Replikations-Origins (*ori*) an. Auch die Transkriptionsrichtung der Gene ist angegeben.

Der Vektor pUC 19 unterscheidet sich vom gezeigten Plasmid lediglich darin, daß hier die MCS um 180° gedreht und komplementär vorliegt.

Insert-tragende Klone (weiße Kolonien) wurden von Insert-freien (blauen) abgetrennt und auf neue Ampicillinplatten transferiert. Dabei wurde ein Kolonienmuster von 52 Klonen pro Platte angelegt, das das simultane Überimpfen der Klone mit Hilfe eines Zahnstempels aus Metall erlaubte. Die Genbank wurde bei 4 °C aufbewahrt. Um das Absterben von Klonen zu verhindern, erfolgten die weiteren Überimpfungen jeweils im Abstand von 6-9 Wochen.

2.1.3 Isolation von Genen aus Plasmid-Genbanken

2.1.3.1 Synthese von Oligonukleotiden

Aufgrund bekannter Aminosäureteilstrecken von Proteinen, deren Gene kloniert und sequenziert werden sollten, wurden degenerierte Oligonukleotide mit Hilfe der Phosphoamidit-Methode synthetisiert. Die Synthese wurde auf einem DNS-Synthesizer 380 A von APPLIED BIOSYSTEMS in der Abteilung Prof. Dr. D. Oesterhelt durchgeführt. Das in ammoniakhaltiger Lösung vorliegende Produkt mußte durch 5-10-stündige Inkubation bei 56 °C von den Basenschutzgruppen befreit und dann im SPEEDVAC-Konzentrator zur Trockne eingengt werden, bevor es nach Aufnahme in H₂O bidest. weiterverwendet werden konnte. Die vorliegende Konzentration wurde nach Messung von E₂₆₀ unter Berücksichtigung der Basenzusammensetzung und der molaren Extinktionskoeffizienten der Nukleotide

$$\epsilon_{\text{dATP}} = 15400 \text{ cm}^2/\text{mM}$$

$$\epsilon_{\text{dCTP}} = 7500 \text{ cm}^2/\text{mM}$$

$$\epsilon_{\text{dGTP}} = 11700 \text{ cm}^2/\text{mM}$$

$$\epsilon_{\text{dTTP}} = 9900 \text{ cm}^2/\text{mM}$$

bestimmt.

An Positionen, die - aufgrund der Degeneration des genetischen Codes - im Oligonukleotid-Gemisch nicht eindeutig definierbar waren, wurde der Extinktionskoeffizient aus dem Mittelwert von ϵ der dort vertretenen Nukleotide berechnet.

Die synthetische DNS wurde immer bei - 20 °C aufbewahrt.

2.1.3.2 Radioaktive Markierung der synthetischen Oligonukleotide

Zur radioaktiven Endmarkierung wurden 100 pM synthetische Oligonukleotid-DNS (5-6 μ l wässrige Lösung) 1 min abgekocht, nach Abkühlen mit 1 μ l 10 mM Spermidin, 1 μ l 10 x Kinasepuffer (10 x Linker-Kinase-Puffer nach Maniatis et al. (1982) mit zusätzlich 10 mM ATP sowie 1 mM KCl), 1-2 μ l γ -(32 P)ATP (10 μ Ci/ μ l) und 1 μ l T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/ μ l) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert.

Der Ansatz war ohne weitere Reinigungsschritte für die Hybridisierung verwendbar. Nicht verwendetes markiertes Material konnte 3-4 Wochen bei - 20 °C in Bleibehältern aufbewahrt werden.

2.1.3.3 Koloniehybridisierung

Zur Vorbereitung der Koloniehybridisierung wurden Nitrozellulose-Rundfilter auf frische Ampicillin-Platten aufgelegt. Mit Hilfe des Zahnstempels wurden E. coli-Zellen von der Genbank auf die Filter übertragen und über Nacht zu Kolonien herangezogen. Diese waren Ausgangspunkt für die weitere Prozedur, die der Vorschrift von Woods (1984) folgte.

Die Hybridisierung wurde bei 37 °C durchgeführt, wobei jeweils 40 Rundfilter übereinander in einer Plastikdose in Gegenwart von 50 ml Hybridisierungspuffer (Zusammensetzung nach Woods, 1984, unter Fortlassung der tRNS) und 1-2 μ l des Kinasierungsansatzes (s.o.) über Nacht leicht geschüttelt wurden.

Die Waschschrte wurden mit steigender Temperatur durchgeführt, bis die Autoradiographie (Expositionszeit 24-48 h) eine sichere Unterscheidung von positiven und Hintergrund-Signalen ermöglichte. Zur Absicherung des Ergebnisses wurde die Koloniehybridisierung mit allen positiven Klonen wiederholt. Als Kontrolle wurden negative Klone (von den Ausgangsplatten) mitgeführt, um das Vergleichssignal für die unspezifische Hybridisierung zu erhalten.

2.1.3.4 Restriktionskartierung positiver Klone

Von allen Klonen, die bei der zweiten Koloniehybridisierung die stärksten Signale ergaben, wurde der rekombinierte pUC-Vektor isoliert,

gereinigt und einer Restriktionskartierung unterzogen. Dabei wurden zur Vereinfachung nur die Restriktionsenzyme verwendet, die in der MCS des Vektors schneiden.

2.1.3.5 Southern-Blot

Um die Oligonukleotid-Hybridisierungsstelle innerhalb der Inserts genauer lokalisieren zu können, wurden die für die Restriktionskartierung im Agarosegel aufgetrennten Fragmente nach Southern (1975) auf Nitrozellulose geblottet und unter den gleichen Bedingungen wie bei der Koloniehybridisierung mit der radioaktiven Sonde hybridisiert.

2.1.4 DNS-Sequenzierung

Die DNS-Sequenzierung wurde generell nach der Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1977) durchgeführt. Die im Detail angewendeten Verfahrensvarianten werden im folgenden beschrieben.

2.1.4.1 Verwendete Enzyme

(a) Sequenzierung mit Klenow-Polymerase

Die DNS-Sequenzierbedingungen mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der E. coli-DNS-Polymerase I wurden der Vorschrift von Heinrich (1986) entnommen. Allerdings wurden die Ergebnisse durch folgende leichte Modifikationen verbessert:

- (i) Erniedrigung der Zugabe an ddATP (2 mM) von 10 μ l auf 1 μ l für die Herstellung der Nukleotidmischung A ("A-Mix")
- (ii) Erniedrigung der Zugabe an ddTTP (2 mM) von 50 μ l auf 10 μ l für die Herstellung der Nukleotidmischung T ("T-Mix")
- (iii) Erhöhung der Primerkonzentration im Annealing-Ansatz auf 4-6 pM
- (iv) Reduktion des Anteils an radioaktivem ^{35}S -dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) von 2 μl auf 1,5 μl

Die Inkubationstemperatur bei der Polymerisierungsreaktion konnte ohne signifikanten Einfluß auf das Ergebnis zwischen 20 und 37 °C variiert

werden.

(b) Sequenzierung mit dem Sequenase-Kit

Es wurden die Angaben des Herstellers (USB) befolgt. Folgende Modifikationen verbesserten die Ergebnisse oder vereinfachten die Handhabung ohne negativen Einfluß auf das Ergebnis:

- (i) 1 µl Sequenase (13 U) genügte vollständig für 9 verschiedene Sequenzierungsansätze
- (ii) Die geforderte Vorinkubation der Terminationsmische bei 37 °C war schlecht praktikabel und unnötig
- (iii) Für das Lesen von Basen sehr dicht (2-10 b) hinter dem Primer sowie zum Erzielen einer generell gleichmäßigeren Bandenintensität vom Lesebeginn bis zur Auflösungsgrenze (normalerweise bei 400-600 b nach dem Primer) war eine Verdünnung des Elongationsgemisches auf 1:16 (statt 1:8) vorteilhaft.

2.1.4.2 Sequenzierstrategien

(a) Gewinnung überlappender Subklone

Für die Sequenzanalyse längerer DNS-Abschnitte (mehr als 600 bp Doppelstrang- oder mehr als 300 b Einzelstrang-DNS) zeigte sich die Gewinnung überlappender Subklone mit Hilfe der Exonuklease Bal 31 nach Guo et al. (1983) als Methode der Wahl. Die Strategie ist in Abb. 2 schematisch dargestellt und wird in der Legende weiter erläutert. Beidseitiges Abdauen von jeweils ca. 150 bp doppelsträngiger DNS pro 1 min konnte durch Einsatz von 2,5 U Bal 31 pro 10 µg DNS bei 37 °C und in Gegenwart eines in bezug auf die NaCl-Konzentration (500 mM statt den von Guo et al., 1983, beschriebenen 600 mM) leicht abgewandelten Puffers erreicht werden. Um den Verdau sehr rasch zu definierten Zeiten stoppen zu können, wurden Gefäße mit 1 Volumen (der zu stoppenden Probe) 200 mM EDTA über 2 Volumina Phenol im Eisbad vorbereitet. Pro Minute wurde ein Aliquot aus dem Bal 31-Ansatz entnommen, in die vorbereiteten Gefäße gegeben und sofort 30 sec geschüttelt. Es folgte eine Chloroformextraktion des Überstandes und die Fällung der DNS mit Ethanol.

(b) Doppelstrang-Plasmid-Sequenzierung

Doppelsträngige Plasmide wurden nach der von Heinrich (1986) beschriebenen Methode zur Sequenzierung vorbereitet. Anstelle des hier irrtümlich mit 0,2 mM NaOH angegebenen Plasmid-Denaturierungspuffers wurde allerdings 0,2 M NaOH verwendet. Bei DNS-Ausgangskonzentrationen von weniger als 0,5 µg (bezogen auf ein 3000-4000 bp großes Plasmid) war mit mehrtägigen Expositionszeiten bei der Autoradiographie zu rechnen (s.u.) Wurden rekombinierte pUC-Plasmide sequenziert, diente als "Vorwärts"-Primer das von Heinrich empfohlene 15-meres Oligonukleotid:

5'-TCCCAGTCACGACGT-3'.

Der empfohlene "Rückwärts"-Primer (Reverse-Sequencing Primer)

5'-AACAGCTATGACCATG-3'

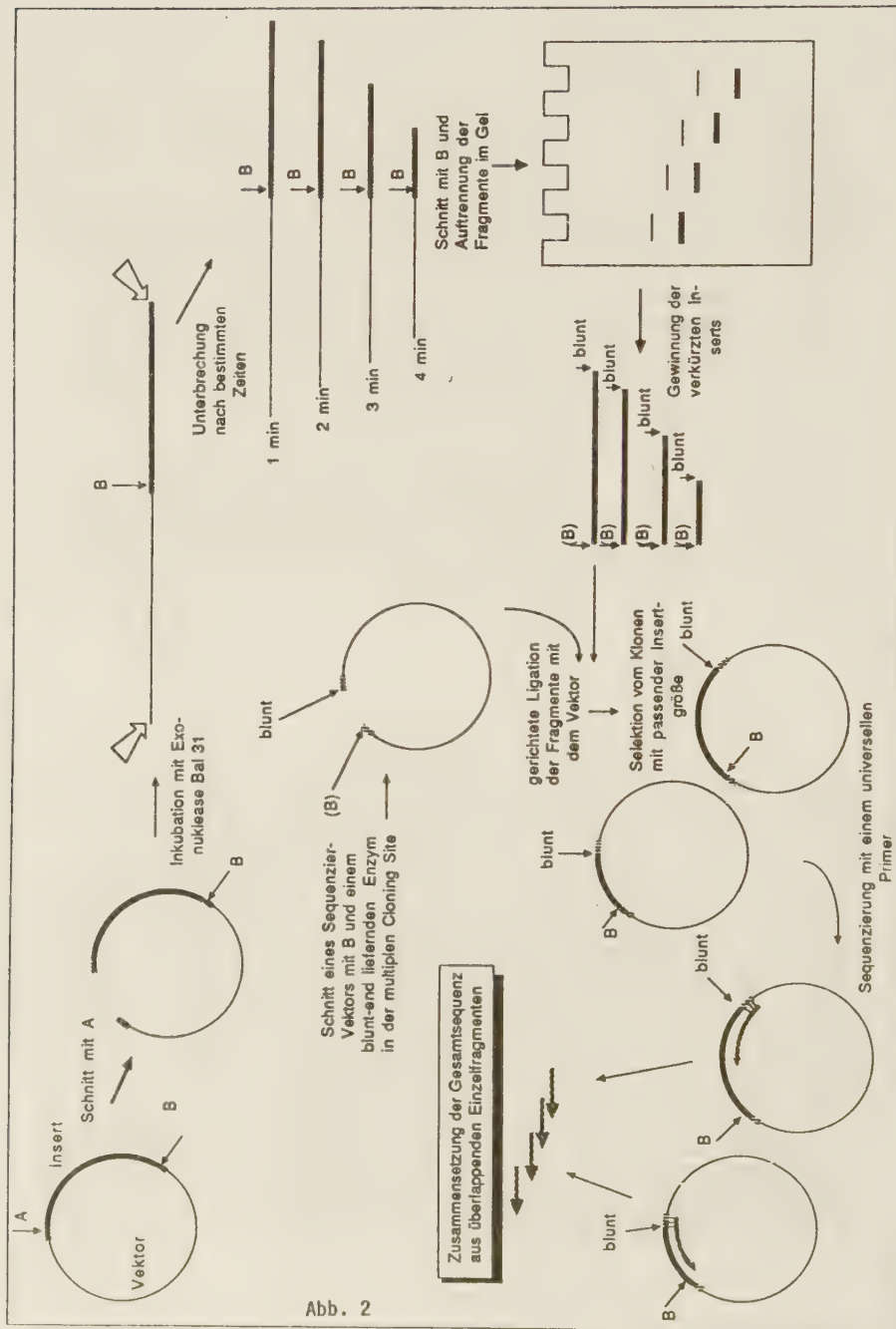
lieferte jedoch fast generell unbefriedigende Ergebnisse (schwache, fehlende oder verschwommene Banden) und wurde später durch ein selbst konzipiertes, mit Computerunterstützung auf maximale Spezifität optimiertes 18-meres Oligonukleotid ersetzt:

5'-CACACAGAAACAGCTAT-3'.

Abb. 2:

Schemadarstellung der Strategie zur Gewinnung überlappender Subklone nach Guo et al. (1983).

Voraussetzung für die Methode ist das jeweils einmalige Vorhandensein zweier Restriktionsschnittstellen (hier als A und B bezeichnet), die das zu sequenzierende Insert in einem rekombinierten Plasmid so flankieren müssen, daß die durch einen Doppelverdau trennbaren Fragmente sich in der Größe unterscheiden. Dadurch können sie später auf einem Gel voneinander getrennt werden. Das Plasmid wird zunächst an der Seite, von der aus die Sequenz gelesen werden soll, geöffnet (hier mit A). Nach Inkubation mit Exonuklease Bal 31 und beidseitigem Verkürzen der DNS liegen immer stumpfe Enden am Doppelstrang vor. Durch Schnitt mit Restriktionsenzym B und Auftrennung der beiden entstehenden Fragmente im Agarosegel kann der interessierende Insert-Anteil wiedergewonnen werden. Wenn B ein versetzt schneidendes Restriktionsenzym war, kann die anschließende Ligation des Fragments in einen Sequenziervektor gerichtet erfolgen. Es werden nur solche Plasmide zum Sequenzieren ausgewählt, in denen der Größenunterschied der Inserts den Auflösungsbereich der Sequenzierung (um 300 b im Normalfall) deutlich unterschreitet. Dadurch kann die Sequenz aus überlappenden Einzelsequenzen leicht zusammengesetzt werden.



Für die Doppelstrang-Sequenzierung anderer Plasmide wurden die erforderlichen Primer ebenfalls mit Computerunterstützung selbst entworfen. Alle diese Oligonukleotide wurden in der Abteilung Prof. Dr. D. Oesterhelt synthetisiert.

(c) Einzelstrang-Plasmid-Sequenzierung

Die Einzelstrang-Sequenzierung wurde sowohl an den pMa/c-Vektoren, als auch mit M13mp18/19-Derivaten durchgeführt. Als Primer dienten im ersten Fall ausschließlich selbst entworfene Oligonukleotide (s.o.), während im zweiten der für diese Proben im Sequenase-Kit für M13-Sequenzierung mitgelieferte "Universalprimer":

5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

verwendet wurde.

Pro Ansatz waren in beiden Fällen 100-200 ng DNS sowie 0,5 - 1 pM Primer ausreichend.

2.1.4.3 Acrylamid-Gelelektrophorese

Harnstoff-Polyacrylamid-Sequenzgele wurden genau nach Vorschrift von Heinrich (1986) hergestellt. Die Laufzeit bei 65 Watt und 60 °C betrug 2 h für die Auflösung der ersten 150-200 b nach dem Primer bzw. 4-6 h für die Auflösung der Sequenzbereiche im Abstand von 150 bis ca. 400 b vom Primer. Durch eine Verlängerung der Laufzeit auf 12 h (50 Watt, 60 °C) konnten bei der M13mp18/19-Einzelstrangsequenzierung sogar noch Sequenzbereiche im Abstand von mehr als 500 b nach dem Primer aufgelöst werden. Auf längere Sicht bewährten sich in allen Fällen am besten 6%-ige Polyacrylamidgele in Keilform, wobei allerdings der bei Heinrich angegebene Spacer III fortgelassen wurde. Die maximale Geldicke im unteren Bereich betrug damit nur 0,6 mm. Die Dauer der Essigsäurefixierung durfte bei diesen Keilgelen 40 min nicht unterschreiten. Danach empfahl sich auch noch eine gründliche Spülung mit H₂O dest., um verbliebenen Harnstoff zu entfernen. Die Trocknung des Gels konnte mit Hilfe eines Warmluftföns beschleunigt werden (Trocknungszeit: 1-1,5 h).

2.1.4.4 Autoradiographie

Autoradiographie erfolgte durch unmittelbares Auflegen des Röntgenfilms auf das an der Ohrenplatte haftende, trockene Gel. Da im Gel verbliebene Harnstoffanteile eine Verklebung des Films mit der Geloberfläche bewirkten, mußte auf deren vollständige Entfernung in den vorherigen Schritten geachtet werden. Die Expositionsdauer für die Autoradiographie variierte von 12 h (bei Verwendung von Sequenase zusammen mit Einzelstrangmatritzen) bis zu mehreren Tagen (Doppelstrangplasmid-Sequenzierung mit sehr geringen DNS-Ausgangskonzentrationen; sequenziert mit Klenow-Polymérase).

2.1.4.5 Aufarbeitung der Sequenzdaten

Autoradiogramme von Sequenzgelen wurden prinzipiell zweimal gelesen und dann mit Hilfe eines im UWGCG (University of Wisconsin Computer Group) -Softwaresystem verfügbaren Sequenzeditors (SEQED) einer elektronischen Dateiverwaltung auf dem VAX II-Rechner übergeben. Alle weiteren Analysen (Restriktionskartierung, Identifizierung offener Leserahmen, Verkettung von Sequenzfragmenten usw.) konnten dann mit der UWGCG- und PIR (Protein Identity Research)-Software vorgenommen werden.

2.1.5 Gezielte Mutagenese

Gezielte Mutagenese mit Hilfe von synthetischen Oligonukleotiden wurde nach der in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.-J. Fritz entwickelten (Kramer et al., 1984) und im Detail verbesserten (Kramer und Fritz, 1987) Gapped Duplex-Methode ausgeführt.

Zum Verständnis des zugrundeliegenden Prinzips dient das Fließschema in Abb. 4a und 4b auf Seite 35f (siehe aber auch 2.1.5.2 und 2.1.5.3).

2.1.5.1 Das verwendete System

Für die von Kramer et al. (1984) beschriebene Methode wurde das pMa/c-Plasmidsystem (Abb. 3) eingesetzt. Dabei fungierte generell pMa5-8 als Akzeptor der zu mutierenden Gene, während pMc5-8 zum Gegenhybridisieren bei der Herstellung der sogenannten "Gapped Duplex" (vgl. Abb. 4a)

verwendet wurde. Die Sequenz beider Plasmide ist vollständig bekannt. Als Empfänger der Heteroduplex diente der zur Reparatur von Basenfehlpaa-
rungen unfähige *E. coli*-Stamm WK6_{mutS}. Die Mutanten-Selektion wurde in *E. coli* WK6 durchgeführt.

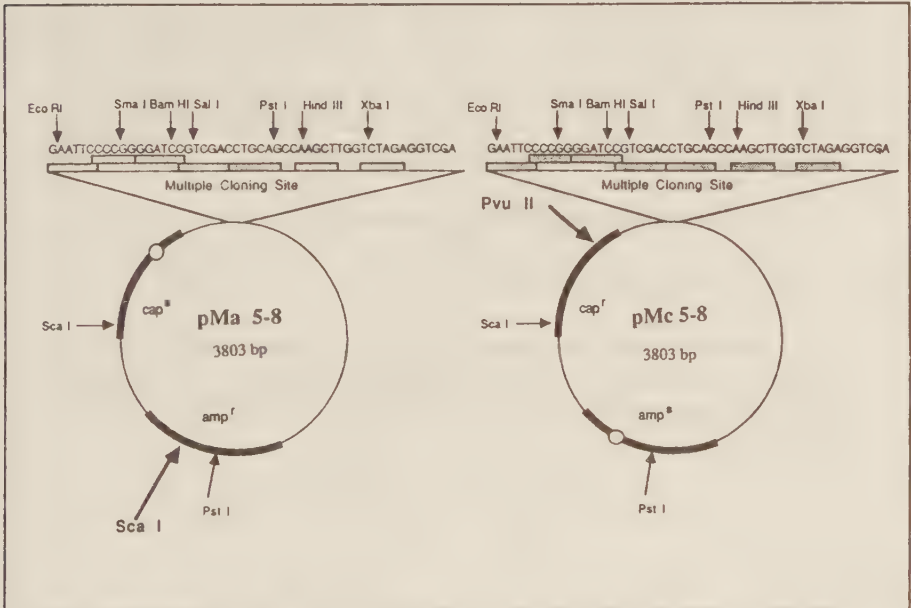


Abb. 3:

Physikalische Karten der Plasmid-Zwillinge des pMa/c-Systems.

Die (identischen) MCSs mit den Erkennungsstellen (schattiert unterlegte Boxen) und Positionen (kleine Pfeile) der dort schneidenden Restriktionsenzyme sind detailliert herausgehoben. Gleichzeitig entspricht der gezeigte Ausschnitt auch der Sequenz des Plus-Strangs. Die Genorte für die beiden Antibiotikum-Resistenzen (*amp* = Ampicillin-, *cap* = Chloramphenicol-Resistenzgen) sind als verdickte Bögen gezeigt. Die jeweiligen Mutationsorte in den Resistenzgenen sind durch kleine Kreise markiert; die durch die Mutation zerstörte Restriktionsschnittstelle durch einen dicken Pfeil im nichtmutierten Partner hervorgehoben. Die hochgesetzten Buchstaben geben an, ob das betreffende Gen funktionell (r) oder zerstört (s) ist. Jedes der beiden Plasmide kann nur eine Resistenz vermitteln, wobei die unterschiedlichen Sca I- und Pvu II-Schnittstellen auch eine physikalische Unterscheidung der Zwillinge ermöglichen.

Durch die Verwendung der Zwillings-Plasmide pMa/c kann erreicht werden, daß nach jeder Mutationsrunde im mutierten Plasmid eine andere Antibiotikum-Resistenz als im parentalen vermittelt wird (der Wechsel erfolgt zwischen Ampicillin- und Chloramphenicol-Resistenz). Dies erlaubt eine einfache Selektion der gewünschten Klone. Die Effizienz, mit der Mutation und Resistenzwechsel gekoppelt sind, ist dabei von einer Reihe von Variablen abhängig. Untersuchungen der Arbeitsgruppe Prof. Dr. H.-J. Fritz (Fritz et al., 1988) ergaben, daß sich mit erhöhtem GC-Gehalt und erhöhter Basenzahl des Mutagenese-Oligonukleotids, durch Reduktion der Anzahl der Fehlpaarungen bei Einführung der Mutation sowie durch Verringerung der Größe des im Duplex-Molekül einzelsträngigen DNS-Bereichs ("gap") deutlich verbesserte Ausbeuten erzielen lassen.

2.1.5.2 Vorgehen beim Gapped Duplex-Verfahren

(a) Gewinnung der Einzelstrang-Matrize

Vom rekombinierten pMa-Plasmid wurde die Orientierung des zu mutierenden Inserts durch Restriktionskartierung bestimmt. Dann wurde der Plus-Strang des Plasmids mit Hilfe von M13K07 wie beschrieben isoliert (s. 2.1.1.5 (b)).

Abb. 4a (S. 35):

Schematisches Fließdiagramm zur Darstellung der Erzeugung eines Heteroduplex-Moleküls bei der gezielten Mutagenese mit der Gapped Duplex-Methode nach Kramer et al. (1984). Verstärkte Kreise stellen die doppelsträngigen Plasmide, dünne die Einzelstrang-Plasmide dar. Die Genorte für Antibiotikum-Resistenzen (amp = Ampicillin-, cap = Chloramphenicol-Resistenz) sind durch dicke Kreisbögen dargestellt. Hochgesetzte Buchstaben geben an, ob das betreffende Gen intakt (r) oder zerstört (s) ist; gleichzeitig ist die Mutationsstelle in diesen Genen durch den Kreis (oder Halbkreis bei Einzelstrang-Plasmiden) dargestellt. Das zu mutierende Insert wird mit dem schraffierten Bogen symbolisiert. Ebenfalls als (dünner) schraffierter Bogen ist das Mutagenese-Oligonukleotid gezeichnet, wobei die Position der erwünschten Fehlpaarung auch hier mit einem kleinen Kreis markiert ist.

Abb. 4b (S. 36):

Schematisches Fließdiagramm zur Erläuterung der Mutantenselektion nach der gezielten Mutagenese. Alle Symbole sind in Abb. 4a erklärt.

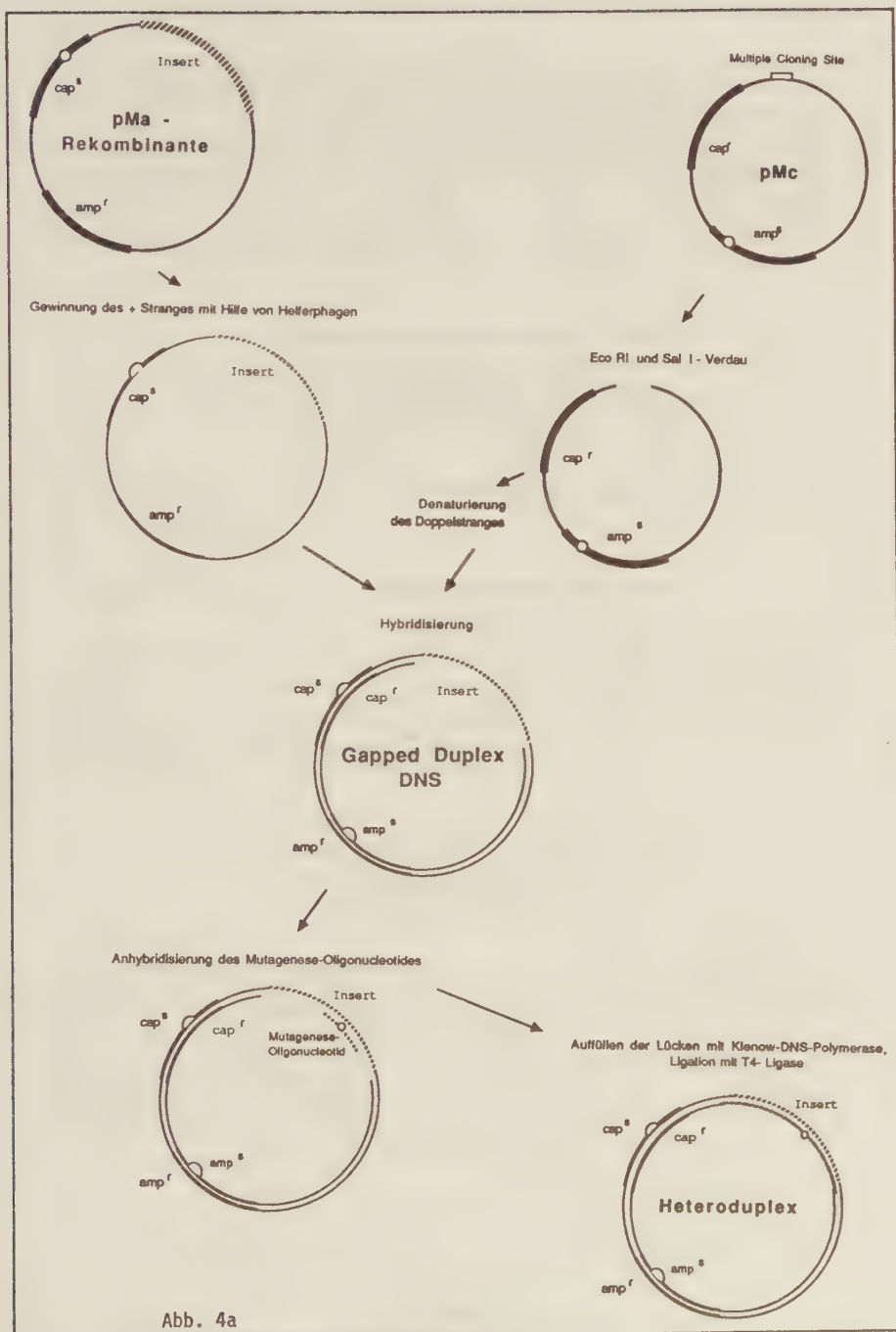
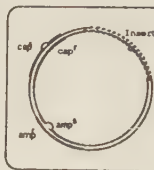


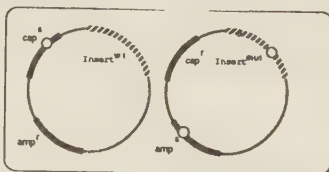
Abb. 4a



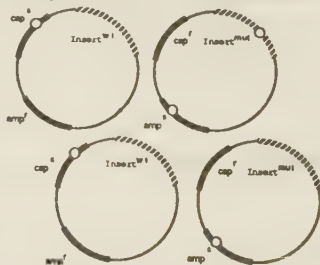
Transformation von einem
E. coli mutS-Stamm (kann
Basenfehlpaarungen nicht
reparieren)



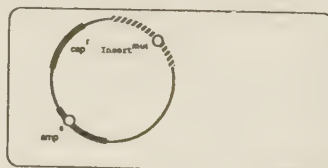
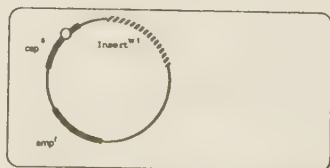
Segregation der Stränge unter Erhaltung der Mutation



Gewinnung einer gemischten Plasmidpopulation



Neue Transformation (unter Bedingungen,
die Doppeltransformanten vermeiden)



Selektion auf Chloramphenicol

wächst nicht

wächst

Abb. 4b

(b) Synthese und Phosphorylierung der Mutagenese-Oligonukleotide

Die zum Plus-Strang der Matrize komplementären Mutagenese-Oligonukleotide wurden in der Abt. Prof. Dr. D. Oesterhelt synthetisiert (s. 2.1.3.1).

Die enzymatische Phosphorylierung erfolgte in folgendem Ansatz:

8 μ l (2 μ g) Oligonukleotid
 1 μ l (10 U) T4-Polynukleotid-Kinase
 1 μ l 10 x Linker-Kinase-Puffer (nach Maniatis et al., 1982)

Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und dann zur Aufbewahrung bei -20 °C eingefroren.

(c) Herstellung der Gapped Duplex

Zur Herstellung der Gapped Duplex-DNS wurde doppelsträngiger pMc5-8 sowohl mit Eco RI als auch mit Sal I zur Verhinderung einer späteren Plasmid-Religation geschnitten und mit der einzelsträngigen pMa-Plasmid-Matrize in folgendem Ansatz vereinigt:

500 ng pMc (Eco RI und Sal I-geschnitten)
 1300 ng rekombinierter, einzelsträngiger pMa
 15 μ l 1,5 M KCl + 100 mM Tris/HCl pH 7,5
 H₂O bidest. ad 120 μ l

Nach Entnahme eines 15 μ l-Aliquots für die Kontrollelektrophorese, die den Zustand des Gemisches vor der Gapped Duplex-Bildung überprüfen sollte, wurde der Ansatz 4 min bei 100 °C inkubiert und dann für 10 min in ein 65°C-Wasserbad überführt. 15 μ l davon wurden für eine Kontrollelektrophorese zur Überprüfung der Gapped Duplex-Formation verwendet und der Rest bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

(d) Hybridisierung des Mutagenese-Oligonukleotids an die Gapped Duplex

Zur Hybridisierung wurde das phosphorylierte Mutagenese-Oligonukleotid auf eine Konzentration von 8 pM/ μ l verdünnt. Davon wurde 1 μ l auf 9 μ l Gapped Duplex-DNS gegeben, 5 min bei 65 °C inkubiert und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Prozedur erlaubt keine Strangdissoziation im Gapped Duplex-Molekül, während das Oligonukleotid zunächst ungebunden vorliegt und erst beim Abkühlvorgang seine komplementäre Sequenz findet.

(e) Polymerisation und Ligation

Nach Erreichen von Raumtemperatur wurden dem Gapped Duplex-Ansatz folgende Lösungen hinzugefügt:

4 μ l 10 x Fill-in-Puffer (625 mM KCl, 275 mM Tris/HCl,
150 mM MgCl₂, 20 mM Dithio-
threitol, 0,5 mM ATP und 0,25 mM
dNTP; pH 7,5)

23 μ l H₂O bidest.

1 μ l (10 U) T4-DNS-Ligase

2 μ l einer in 1 x Fill-in-Puffer von 5 U/ μ l auf 0,5 U/ μ l
verdünnten Klenow-Polymerase

Die Vorbehandlung der Klenow-Polymerase war erforderlich, um (bei der späteren Transformation störendes) Phosphat, das sich im Aufbewahrungspuffer käuflicher Polymerasen befindet, zu verdünnen (H.-J. Fritz, pers. Mitteilung). Die Auffüllung der in der Gapped Duplex vorhandenen Einzelstrangbereiche ("gaps") sowie die Ligation der Enden wurde mit 45-minütiger Inkubation des obigen Ansatzes bei 20 °C durchgeführt. Die entstandenen Heteroduplex-Moleküle wurden dann zur Transformation von E. coli WK6mutS verwendet.

Das Schema für den bisher beschriebenen Teil des Verfahrens findet sich in Abb. 4a).

2.1.5.3 Selektion der Mutanten

In Abb. 4b sind die ersten Schritte bis zur Isolierung Chlorampheni-

col-resistenter Einzelklone veranschaulicht. Alle im Heteroduplex-Transformationsansatz befindlichen E. coli WK6mutS- Zellen wurden 40 min in 2 ml Antibiotikum-freiem Vollmedium regeneriert und dann über Nacht in 30 ml Medium (unter Zugabe von Chloramphenicol) weitergezogen (37 °C). Aus den Zellen wurde die gemischte Plasmidpopulation isoliert (es bewährte sich das in 2.1.1.4 (b) beschriebene Verfahren), gelelektrophoretisch kontrolliert und dann zur Transformation von E. coli WK6 verwendet. Diese Transformanten wurden auf Chloramphenicolplatten ausgebracht. Resistente Einzelkolonien wurden isoliert, ihre Plasmide im Minipräparationsverfahren (s. 2.1.1.3 (a)) gewonnen und durch Restriktionsverdau analysiert. Von Plasmiden mit dem erwarteten Restriktionsmuster wurde aus den Stammklonen das einzelsträngige Plus-Derivat gewonnen und die Mutationsstelle mit Hilfe passender Primer durch DNS-Sequenzierung kontrolliert. In Plasmiden mit der gewünschten Mutation wurde dann das gesamte Gen durch Sequenzierung überprüft.

2.1.6 Heterologe Expression archaebakterieller Gene in E. coli

2.1.6.1 Das verwendete System

Für die Expression von Fremdgenen in E. coli wurde das Plasmid pJF 118EH (Abb. 5) verwendet. Es enthält einen starken, IPTG-induzierbaren synthetischen Promotor (tac-Promotor) sowie auch das Gen für dessen Repression ($lac i^q$). 5 bp nach der hinter dem Promotor befindlichen Shine-Dalgarno-Sequenz beginnt die MCS, die das Einfügen von heterologen Strukturgenen mit eigenem Startcodon ermöglicht. Dadurch können unfusionierte Genprodukte erhalten werden. Überdies erlaubt die vorliegende Anordnung die Einstellung eines optimalen Abstands zwischen RBS und Startcodon.

Als Empfänger für rekombinierte pJF118-Plasmide wurde E. coli JM 83 und E. coli WK6 verwendet.

2.1.6.2 Selektion exprimierender Klone

Nach Ligation von pJF118EH mit dem gewünschten Gen und Transformation von oben genannten E. coli-Stämmen wurden alle Plasmid-tragenden Klone auf Ampicillinplatten selektiert. Um exprimierende Klone von nichtexpri-

mierenden (mit falsch orientierten Inserts bzw. religierten Vektoren) unterscheiden zu können wurde ein einfaches Selektionsverfahren entwickelt. Es basierte auf der Überlegung, daß eine starke Induktion des synthetischen tac-Promotors das Wachstum von Klonen, die einen nachgeschalteten exprimierbaren Leserahmen besitzen, negativ beeinflussen wird, da ein Großteil der zellverfügbaren Energie zur Realisierung dieser genetischen Information aufgewendet werden muß. Dagegen sollten Klone ohne oder mit nur kurzen (zufälligen) Leserahmen von der Induktion kaum betroffen werden.

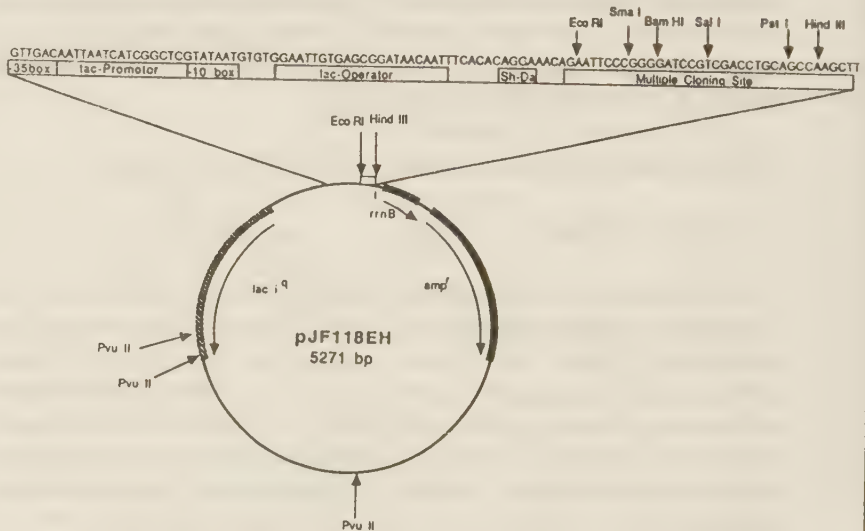


Abb. 5:

Physikalische Karte des Expressionsvektors pJF118EH.

Die Position der wichtigsten Genorte (amp^r = Resistenzgen für Ampicillin, $lac i^q$ = Überproduktions-Gen für den Laktoseoperon-Repressor, $rrnB$ = Genabschnitt aus dem *E. coli*- $rrnB$ -Operon, der das 5S-rRNS-Gen mit seinen zwei starken Terminatoren enthält) sind durch verdickte Kreisbögen gezeigt. Die Transkriptionsrichtung der Gene ist ebenfalls angegeben. Der Ausschnitt, der den synthetischen tac-Promotor, die Ribosomenbindungsstelle (=Sh-Da) sowie die Multiple Cloning Site trägt, ist detailliert dargestellt.

Die Sequenz des Vektors wurde mit Hilfe der Angaben von Fürste et al. (1986) sowie unter Einbeziehung relevanter Daten aus der Plasmid-Datenbank der MPI-Rechenanlage zusammengestellt, da sie nie publiziert wurde.

Das Verfahren wurde folgendermaßen durchgeführt:

Frisches Ampicillin-Flüssigmedium wurde in die Kammern von sterilen Mikrotiterplatten (150 μ l Medium pro Kammer) gefüllt. Die Kammern wurden mit Hilfe eines Zahnstochers beimpft und die Platten dann bei 37 °C leicht geschüttelt. Nach Auftreten einer erkennbaren Trübung im Medium wurden einige der Zellen mit Hilfe eines Stempels auf vorgewärmte IPTG-haltige Ampicillinplatten (7 mg IPTG pro Platte, unmittelbar vor Gebrauch als wässrige Lösung auf die Plattenoberfläche ausgebracht) und parallel dazu auf Platten ohne IPTG transferiert. Nach 5-7 h Bebrütung bei 37 °C wurden die Klone, die zwar auf der Kontrollplatte, nicht aber in Gegenwart von IPTG zu sichtbarer Koloniengröße herangewachsen waren (s. Abb. 6) isoliert und mit Hilfe von Restriktionskartierung und DNS-Sequenzierung genau charakterisiert.

Abschließend wurde in Klonen, die in der Voruntersuchung alle geforderten Kriterien erfüllten, das heterologe Genprodukt mit Hilfe spezifischer Enzymtests (vgl. 2.2.1 und 2.2.4.1) nachgewiesen.

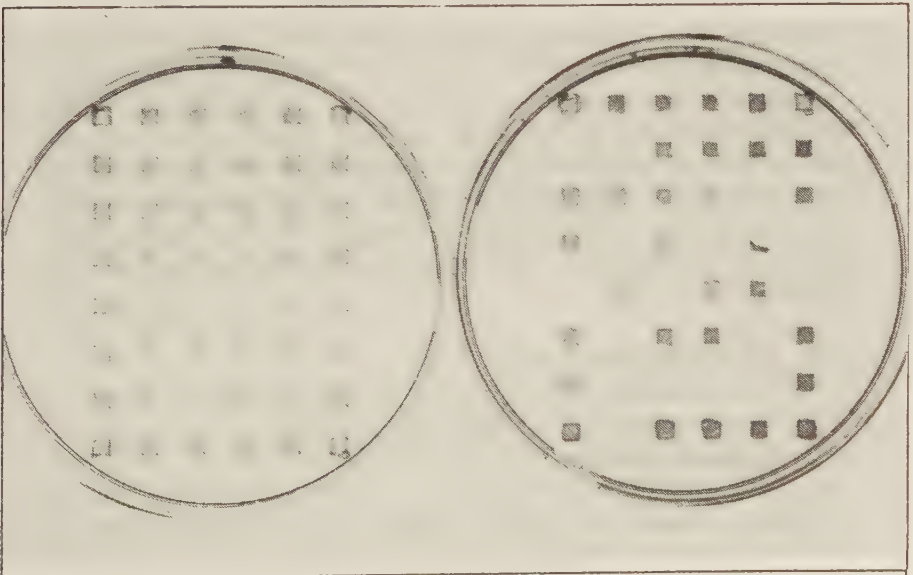


Abb. 6:

Ampicillin-Selektionsplatten zur Unterscheidung von exprimierenden und nichtexprimierenden *E. coli*-Klonen mit dem rekombinierten pJF118EH-Plasmid. Auf der rechten Platte sind 7 mg IPTG ausgebracht, auf der linken dagegen nicht. Beide Platten sind gleich lang bebrütet worden (6 h). Exprimierende Klone zeigen auf der Induktor-haltigen Platte keine Kolonienbildung.

2.2 Arbeiten mit Proteinen

2.2.1 M. fervidus-GAPDH-Enzymtest

Die Messung der durch die GAPDH katalysierten Stoffwechselreaktion erfolgte photometrisch. Dabei wurde die durch Oxidation/Reduktion des Cosubstrates bedingte Extinktionsänderung bei 366 nm verfolgt.

2.2.1.1 Vorwärts-Reaktion

Bei der als Vorwärts-Reaktion bezeichneten GAPDH-Katalyse findet folgender Umsatz statt:



Der Test wurde immer bei 70 °C durchgeführt. Für das Vorgehen bei der Messung dieser Katalyse wird auf die ausführlichen Darstellungen in früheren Arbeiten verwiesen (S. Fabry, Diplomarbeit, 1986; Fabry und Hensel, 1987).

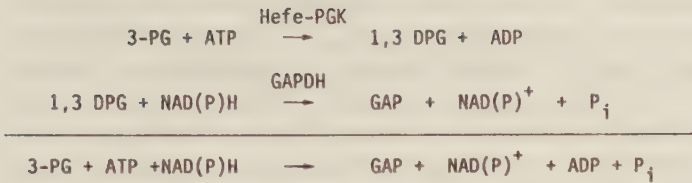
Beim Test von Rohextrakten aus exprimierenden E. coli-Kulturen war eine Vorinkubation (30 min, 75 °C) nötig, um eine Trübung durch präzipitierende Proteine in der Küvette zu vermeiden. Dabei wurde gleichzeitig die kontaminierende E. coli-GAPDH eliminiert. Eine weitere Möglichkeit zur Inaktivierung der E. coli-GAPDH bestand in einer 10-minütigen Vorinkubation in Gegenwart von Pentalenolakton (2 µg pro 100 µl Rohextrakt).

2.2.1.2 Rückwärts-Reaktion

Als Rückwärts-Reaktion sei die 1,3 DPG-Reduktion nach folgender Reaktionsgleichung definiert:



Diese Aktivitätsmessung erfolgte prinzipiell bei 40 °C mit Hilfe eines gekoppelten enzymatischen Tests ausgehend von 3-PG:



Folgender Testansatz wurde gewählt:

800 μl 100 mM MOPS pH 7,5
 + 10 μl 200 mM MgCl_2

wurden in einer verstöpselten 1 ml-Glasküvette auf 40 °C vorgewärmt. Danach wurden (in der angegebenen Reihenfolge) zugefügt:

25 μl 100 mM ATP
 20 μl NADPH (wässrige Lösung von 2 mg/ml)
 50 μl 200 mM 3-PG
 5 μl Phosphoglycerat-Kinase aus Hefe (Suspension von 10 mg/ml)
 20-50 μl GAPDH-Lösung

Rohextrakte, die kontaminierende *E. coli*-GAPDH enthielten, konnten mit diesem Testsystem ohne Vorbehandlung spezifisch auf *M. fervidus*-GAPDH-Aktivität getestet werden, da das eubakterielle Enzym das phosphorylierte Cosubstrat nicht umsetzt.

2.2.2 GAPDH-Enzymreinigung

2.2.2.1 Isolierung der *M. fervidus*-GAPDH aus *M. fervidus*

Es wurden im wesentlichen die früher beschriebenen Reinigungsschritte durchgeführt (S. Fabry, Diplomarbeit, 1986; Fabry und Hensel, 1987). Für die Affinitätschromatographie wurde alternativ zu Dextranblau-Sepharose auch Matrex Gel Red A eingesetzt. In diesem Falle erfolgte die Enzym-Elution mit 1 mM NADP^+ in 10 mM K-Phosphatpuffer pH 8,3 + 30 mM Mercaptoethanol (vgl. 2.2.2.2).

Zur Entfernung des im Elutionspuffer teilweise mit ausgewaschenen

Farbstoffes mußte hier allerdings ein Chromatographieschritt in Gegenwart von NADP^+ über eine Zweischicht-Minisäule (0,5 cm Säulendurchmesser; obere Schicht: 0,25 ml Säulenbettvolumen Aminohexylsepharose; untere Schicht: 3 ml Säulenbettvolumen Hydroxylapatit; Spülpuffer: 100 ml 10 mM K-Phosphat (100 ml), Elutionspuffer: 500 mM K-Phosphat (Puffer jeweils + 30 mM Mercaptoethanol + 1 mM NADP^+ ; pH 7,5)) angeschlossen werden. Nach Dialyse über Nacht gegen 3 Liter 10 mM K-Phosphat + 30 mM Mercaptoethanol, pH 7,5, wurde das Cosubstrat über eine Hydroxylapatit-Minisäule abgetrennt. Abgesehen vom Fehlen des NADP^+ in den Puffern waren die Chromatographiebedingungen diesselben wie bei der Zweischicht-Minisäule.

2.2.2.2 Isolierung der M. fervidus-GAPDH sowie von GAPDH-Mutanten aus E. coli

Wildtyp-M. fervidus-GAPDH und gentechnologisch hergestellte GAPDH-Mutante wurden aus entsprechenden E. coli-Kulturen (s. 2.1.6) nach folgender Prozedur gewonnen: 10–30 g Zellen wurden in maximal 30 ml 500 mM K-Phosphat-Puffer (pH 7,5; + 30 mM Mercaptoethanol) suspendiert, durch dreimalige French-Press-Passage (1200 atm) aufgeschlossen und in einem JA-20-Rotor bei 15000 UpM und 20 °C abzentrifugiert. Bei der Wildtyp-GAPDH wurde die anschließende Hitzefällung des gewonnenen Überstands (Rohextrakt) 30 min bei 80 °C, bei den GAPDH-Mutanten nur bei 75 °C durchgeführt. Nach Entfernung der hitzepräzipitierten Proteine durch Zentrifugation (wie oben) erfolgte nur bei der Mutein-Reinigung noch eine fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat (bei Raumtemperatur), wobei im ersten Schritt (0–65% Sättigung) Fremdprotein abgetrennt und im zweiten (65–100% Sättigung) die Mutein-haltige Fraktion in den Niederschlag gebracht wurde (Zentrifugationsbedingungen wie oben). Nach deren Lösung in 5–10 ml 10 mM K-Phosphat + 30 mM Mercaptoethanol, pH 7,5, und einer Dialyse über Nacht gegen 3 Liter des gleichen Puffers verlief die weitere Prozedur dann in allen Fällen wieder gleich:

Die enzymhaltige Fraktion wurde auf eine mit Dialysepuffer äquilibrierte Matrex Gel Red A-Säule (Säulendurchmesser 3,3 cm; 60 ml Säulenbettvolumen) aufgetragen. Anschließend wurde die Säule folgendermaßen gespült:

100 ml 10 mM K-Phosphat + 30 mM Mercaptoethanol, pH 7,5

800 ml 10 mM K-Phosphat + 30 mM Mercaptoethanol + 200 mM KCl, pH 7,5

100 ml 10 mM K-Phosphat + 30 mM Mercaptoethanol, pH 7,5

Das Enzym wurde mit 75 ml 10 mM K-Phosphat + 30 mM Mercaptoethanol + 1 mM NADP⁺, pH 7,5, eluiert. Die Entfernung von Farbstoff und Cosubstrat aus der Enzympräparation wurde mit Hilfe von Minisäulen vorgenommen wie in 2.2.2.1 angegeben.

Die Reinheit aller Enzyme wurde mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid-Gel-elektrophorese wie beschrieben (Fabry und Hensel, 1987) überprüft.

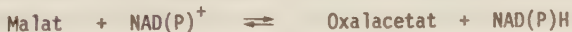
2.2.3 Bestimmung der Thermostabilität von GAPDH und GAPDH-Muteinen

Die Bestimmung der Enzym-Thermostabilität wurde durch Messung der Restaktivität nach 30 min Inkubation bei der gewünschten Temperatur bestimmt. Dazu wurden 50 µl Enzym-Lösung (Konzentration: 30 µg/ml; Inkubationspuffer: 10 mM K-Phosphat bzw. 500 mM K-Phosphat, jeweils + 30 mM Mercaptoethanol, pH 7,0 und durch Auskochen und Abkühlen unter Stickstoff-Begasung sauerstofffrei gemacht) unter anaeroben Bedingungen (Anaerobenzelt) in Glaskapillar-Gefäße eingefüllt und zugeschmolzen. Die Kapillaren wurden aus Pasteur-Pipetten gezogen. Nach der Inkubation wurden die Kapillaren sofort in Eiswasser gegeben und erst kurz vor dem Test aufgebrochen. Die Test-Temperatur betrug für die Wildtyp-GAPDH und die Muteine 70 °C, für die zum Vergleich mituntersuchte M. bryantii-GAPDH dagegen 40 °C.

2.2.4 Nachweis E. coli-exprimierter M. fervidus-MDH

2.2.4.1 MDH-Aktivitätstest

Die MDH von M. fervidus katalysiert die folgende Reaktion (vgl. auch E. Honka, Diplomarbeit, 1989; Honka et al., zur Publikation eingereicht):



Die Messung der MDH-Aktivität erfolgte photometrisch bei 366 nm (s.

2.2.1).

Im "Standard"-Test (Malat-Oxidation) wurde folgende Testlösung eingesetzt:

800 μ l 100 mM K-Phosphat pH 8,0
 100 μ l 100 mM L-Malat (in 100 mM K-Phosphat pH 8,0)
 100 μ l 100 mM NAD⁺ (in 100 mM K-Phosphat pH 8,0)
 20-15 μ l Enzym

Test-Temperatur: 70 °C

Ebenso wie bei der Aktivitätsbestimmung der M. fervidus-GAPDH (s. 2.1.1.1) mußte den Rohextrakt-Messungen eine Hitzeinkubation (15 min, 75 °C) vorausgehen, um Trübungen in der Küvette zu vermeiden sowie die E. coli-MDH zu eliminieren.

Der Testansatz für die Bestimmung der MDH-Aktivität in Richtung der Oxalacetat-Reduktion war folgendermaßen zusammengesetzt:

860 μ l 100 mM K-Phosphat pH 8,0
 20 μ l 75 mM Oxalacetat
 20 μ l 20 mM NADPH
 20-50 μ l Enzym

Test-Temperatur: 40 °C

Da die E. coli-MDH mit dem phosphorylierten Cosubstrat kaum katalytische Aktivität zeigt, konnte dieser Test auch bei Rohextrakten ohne vorherige Hitzebehandlung durchgeführt werden.

2.2.4.2 Gewinnung von M. fervidus-MDH aus E. coli

Ausgehend von 10 g Naßzellen eines M. fervidus-MDH exprimierenden E. coli-Klons (Induktion bei OD₅₇₈=1,0 mit 1 mM IPTG, Induktionsdauer 5 h) folgte die Reinigung des heterologen Enzyms im Prinzip dem bewährten Original-Reinigungsverfahren (E. Honka, Diplomarbeit 1989, Honka et al., zur

Publikation eingereicht): Nach Zellaufschluß in Gegenwart von Homogenisationspuffer (0,1 M Tris/HCl + 30 mM Mercaptoethanol, pH 8,0) in der French-Press (1200 atm, drei Passagen) erfolgte eine Hitzeinkubation der Suspension bei 80 °C (30 min) sowie die Entfernung des präzipitierten Materials (JA-20-Rotor, 15000 UpM, 30 min, 20 °C). Anschließend wurde der Überstand einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen (0-60% Sättigung: Entfernung von kontaminierenden Proteinen; 60-90% Sättigung: Fällung der MDH-haltigen Fraktion; Zentrifugationen wie oben; alle Schritte bei Raumtemperatur). Nach Resuspension des MDH-haltigen Proteinpellets in 5 ml Homogenisationspuffer und Dialyse über Nacht gegen 2 Liter 10 mM K-Phosphat + 30 mM Mercaptoethanol (pH 8,0) wurde eine Affinitätschromatographie über Dextranblau-Sepharose angeschlossen. Dazu wurde die Enzymlösung auf eine entsprechende, mit 10 mM K-Phosphat + 30 mM Mercaptoethanol (pH 8,0) äquilibrierte Säule (Säulendurchmesser 3,3 cm, Säulenbettvolumen 150 ml) aufgebracht. Die Säule wurde mit zwei Säulenvolumina 10 mM K-Phosphat + 30 mM Mercaptoethanol (pH 8,0) gespült und die *M. fervidus*-MDH in Gegenwart von 5 mM NAD⁺ im gleichen Puffer eluiert. Die Entfernung des Cosubstrats erfolgte mit Hilfe einer Hydroxylapatit-Minisäule analog zu dem in 2.2.2.1 angegebenen Verfahren; allerdings enthielt der Elutionspuffer nicht 500 mM, sondern 200 mM K-Phosphat (pH 8,0).

2.3 Computerunterstützte Proteinsequenzanalysen

2.3.1 Sequenzalignments und Konstruktion phylogenetischer Stammbäume

Für eine paarweise Ausrichtung von je zwei Proteinsequenzen nach dem Algorithmus von Needleman und Wunsch (1970) konnte das im UWGCG-Softwarepaket vorhandenen Alignment-Programm "GAP" verwendet werden. Ausrichtungen von mehreren Sequenzen wurden dagegen durch wiederholte Anwendung des UWGCG-Programms "PROFILEGAP" (nach Gribskov et al., 1987) durchgeführt, wobei die Paarungsrunden mit den einfach ausrichtbaren Sequenzen begonnen und den schwierigeren fortgesetzt wurden. Zur Überprüfung der Ausrichtungsqualität im Alignment wurden zusätzlich einzelne Sequenzpaarungen mit einem sensiblen Alignment-Programm (entwickelt von Argos, 1987; durchgeführt von M. Vingron, EMBL Heidelberg) vorgenommen; danach

wurde das Ergebnis weiter verbessert.

Für die Konstruktion phylogenetischer Bäume wurden die Ähnlichkeiten zwischen jeweils zwei Sequenzen des Alignments sowohl auf der Basis von Identitäten als auch nach der Mutational Matrix von Dayhoff (1978) bestimmt. Das sich daraus ergebende Maß für die Verschiedenheit wurde einer Korrektur für überlagerte Mutationen nach Feng et al. (1985) unterzogen. Danach erfolgte schließlich die Berechnung der phylogenetischen Stammbäume nach dem Algorithmus von Fitch und Margoliash (1967) mit Hilfe eines von Dr. P. Palm (MPI für Biochemie, Martinsried) geschriebenen und freundlicherweise zur Verfügung gestellten FORTRAN-Programms.

2.3.2 Berechnung physikalischer Strukturparameter

Hydropathie-, Amphipathie- und Flexibilitätsprofile für die Proteinsequenzen wurden aus den physikalischen Parametern Hydropathie (Kyte und Doolittle, 1982), hydrophobes Moment (Eisenberg et al., 1984) und Temperaturfaktor der C_{α} -Atome (B_{norm} -Wert; Karplus und Schulz, 1985) berechnet. Diese Kalkulationen wurden freundlicherweise von T. Niermann (Biozentrum der Universität Basel) durchgeführt.

Ergebnisse

1. Untersuchungen an der M. fervidus-GAPDH

1.1 Das gap-Gen und die daraus abgeleitete GAPDH-Primärstruktur

1.1.1 Isolierung und Sequenzierung des gap-Genes

Die angewendete Strategie kann in einem begleitenden Fließdiagramm (Abb. 7) mitverfolgt werden. In Klammer gesetzte Zahlen verweisen auf die entsprechende Nummer in der Abbildung.

1.1.1.1 Aufbau einer repräsentativen Plasmidgenbank

Da neben dem gap-Gen weitere Gene von M. fervidus isoliert werden sollten (mdh-Gen: E. Honka, Diplomarbeit 1989; Gen des S-Layer-Proteins: S. Fabry, G. Bröckl und H. König, Manuskript in Vorbereitung) wurde als Ausgangsbasis für die Klonierungsarbeiten eine das M. fervidus-Genom repräsentierende Genbank angelegt. Hierzu wurde chromosomale DNS aus M. fervidus (1) mit dem Restriktionsenzym Sau 3 A partiell verdaut (2) und die fragmentierte DNS mittels Sucroседichtegradientenzentrifugation nach Größe aufgetrennt (3). Fragmente geeigneter Länge (4000-20000 bp) wurden in Bam HI-geschnittenen, dephosphorylierten Vektor pUC 18 einligiert (4). Die anschließende Transformation (5) erbrachte pro 500 ng Fragment und 100 ng Vektor etwa 800 rekombinierte Klone (6), die in ihren Plasmiden eine durchschnittliche Insertgröße von 7000 bp aufwiesen (vgl. Tab. 1). Legt man bei der Berechnung der Mindestzahl von Klonen einer repräsentativen Genbank eine Genomgröße von $4,1 \times 10^6$ bp zugrunde (dies entspricht den größten bekannten archaebakteriellen Genomen von Halobacterium halobium und Halococcus morrhuae; Moore und McCarthy, 1969; die Genomgröße von M. fervidus ist nicht beschrieben), erfordert eine 99,99%ige Repräsentanz eine Mindestzahl von ca. 3000 Klonen (Maniatis et al., 1982). Nach fünf Transformationen lag eine Genbank von insgesamt 4250 Klonen vor (7), die damit das M. fervidus-Genom sicher repräsentierte.

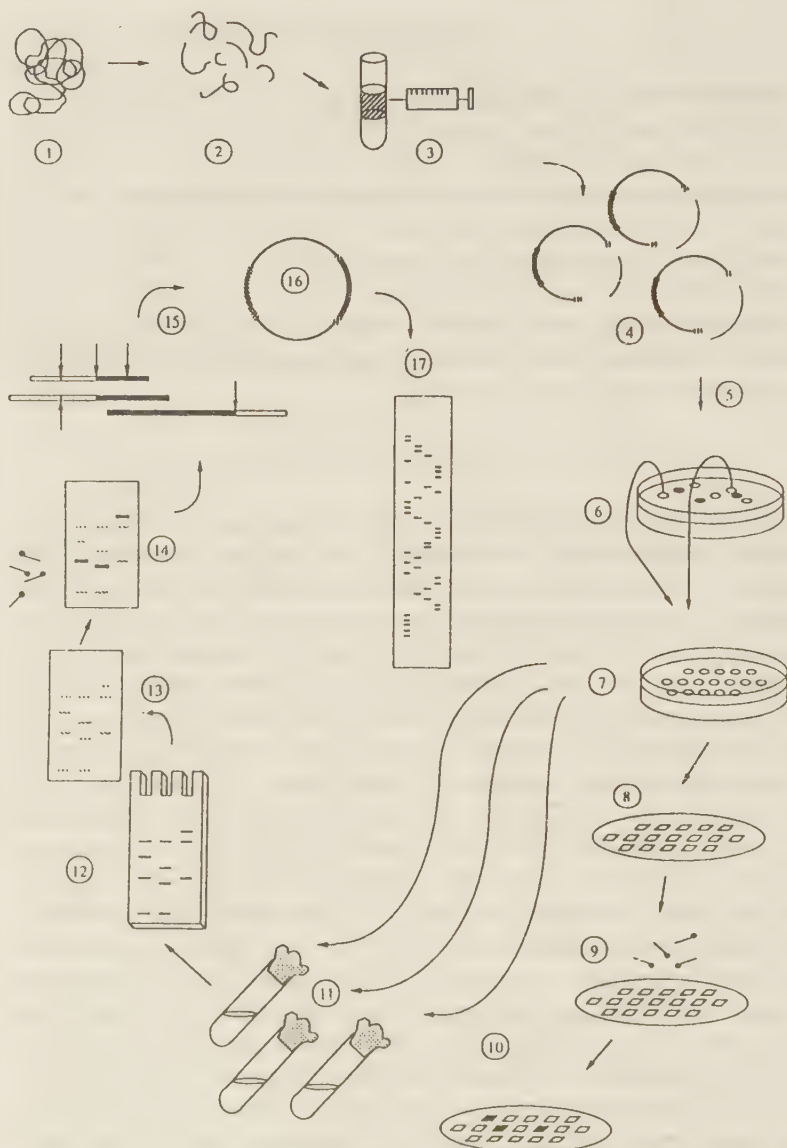


Abb. 7:
Fließdiagramm zur Darstellung der Isolierung eines Gens aus einer repräsentativen Genbank. Die mit Nummern gekennzeichneten Einzelschritte werden im Text näher erläutert.

Tabelle 1

Insertgrößen von rekombinierten Plasmiden der *M. fervidus*-Genbank. Es wurden zwei verschiedene Fraktionen chromosomaler DNS mit unterschiedlicher Fragmentgröße (Fraktion I: 8000-20000 bp; Fraktion II: 4000-10000 bp) zur Ligation mit pUC 18 verwendet.

Probe Nr.	Transformation 1 Fraktion II	Transformation 2 Fraktion I	Transformation 3 Fraktion II	Transformation 4 Fraktion II	Transformation 5 Fraktion I
1	2000 bp	16900 bp	3200 bp	3900 bp	5200 bp
2	3700 bp	17000 bp	2500 bp	8800 bp	11500 bp
3	3650 bp	10800 bp	4000 bp	10400 bp	8800 bp
4		10500 bp	4000 bp	9200 bp	9000 bp
5		5400 bp	8500 bp	7600 bp	8700 bp
6				4800 bp	7700 bp
Durchschnitt	3100 bp	11900 bp	4400 bp	7400 bp	8500 bp

1.1.1.2 Genbank-Screening

Da aus früheren Arbeiten (S. Fabry, Diplomarbeit 1986; Fabry und Hensel, 1987) bereits GAPDH-Teilsequenzen von 13 tryptischen Peptiden der *M. fervidus*-GAPDH vorlagen, konnte diese Information zur Synthese einer Oligonukleotid-Sonde genutzt werden. Zur Rückübersetzung in die Aminosäuresequenz wurde die Nukleotidfolge ausgewählt, die unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes die geringste Zahl an Oligonukleotidvarianten ermöglichte. Der Anforderung wurde die Aminosäurefolge E-M-E-E-D-K-Y am besten gerecht. Die Sequenz erlaubte die Synthese einer Oligonukleotidschar von 20 b Länge mit nur 32 verschiedenen Varianten (Abb. 8).

Mit dieser Sonde wurde eine Koloniehybridisierung bei niedriger Stringenz (Hybridisierungstemperatur 20 °C, Waschttemperatur 37 °C) durchgeführt (8,9). Von den zunächst isolierten 83 positiven Klonen wurden nach Wiederholung der Hybridisierung 25 in die engere Wahl gezogen (10,11). Eine weitere Eingrenzung ergab sich nach Restriktionsanalyse ihrer Plasmide und Filter-Hybridisierung der Fragmente mit der Oligonukleotid-Sonde (12-15). Von den schließlich verbliebenen elf Klonen zeigten

sechs Gemeinsamkeiten im Plasmid-Restriktionsmuster (6B4, 11C8 (identisch mit 22H1 und 22H4), 42C1 und 73A2; s. Abb. 9). Diese wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet.



Abb. 8:

Nukleotidsequenz des synthetischen Oligonukleotides (unten) zur Identifikation des *M. fervidus*-gap-Gens. Die Basenfolge wurde aus der Aminosäuresequenz eines tryptischen Peptids der GAPDH (oben) abgeleitet.

1.1.1.3 Sequenzierung des gap-Gens

Die geringe Größe sowie die Randlage des hybridisierenden 480 bp Pst I-Fragments der Plasmide aus Klon 11C8 bzw. 22H1 oder 22H4 begünstigte eine rasche Beantwortung der Frage, ob das Hybridisierungssignal das gesuchte Gen markierte. Bei der direkten Ansequenzierung des Inserts vom Vektor aus (16,17) wurde eine mit der Sequenz der Oligonukleotid-Sonde übereinstimmende Nukleotidfolge gefunden. Aus dem sequenzierten Teilbereich konnte außerdem eine Aminosäuresequenz abgeleitet werden, in der Sequenzen von drei tryptischen Peptiden der *M. fervidus* GAPDH wiedererkannt wurden. Somit stand fest, daß in dem hybridisierenden Fragment ein Teil des gap-Gens enthalten war. Durch die Teilsequenzierung konnte auch die Orientierung des Gens festgelegt werden. Nach Sequenzierung angrenzender Restriktionsfragmente sowie überlappender Subfragmente nach Bal 31-Exonukleaseverdau konnte die Nukleotidfolge des gesamten Gens einschließlich seiner flankierenden DNS-Bereiche rekonstruiert werden. Die Restriktionskarte sowie eine Übersicht über die angewandte Sequenzierungsstrategie wird in Abb. 10 gezeigt.

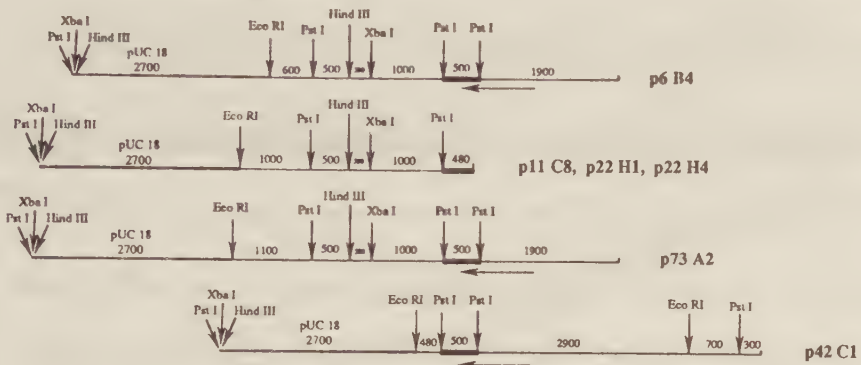


Abb. 9:
Restriktionskarten der gap-Gen-tragenden Plasmide der *M. fervidus*-Genbank. Die Zahlen geben die Länge (in bp) der jeweiligen Restriktionsfragmente an. Das hybridisierende Pst I-Fragment ist dick hervorgehoben, der gestrichelte Pfeil bezeichnet die Lage sowie die Transkriptionsrichtung des gap-Gens.

1.1.2 Sequenzeigenschaften des gap-Gens und der flankierenden DNS-Abschnitte

Der sequenzierte DNS-Bereich umfaßt 1749bp (Abb. 11). Im stromabwärts vom gap-Gen gelegenen Bereich wird das sequenzierte Fragment durch eine Bsm I-Schnittstelle begrenzt. Die Grenze der Stromaufwärts-Region war durch einen Bal 31-Subklon (R3-2) vorgegeben. Das Strukturgen für die GAPDH beginnt an Pos. 434 mit dem Startcodon ATG, besteht aus 1011 bp und wird durch zwei unmittelbar aufeinanderfolgende TAA-Stopcodons terminiert. Vor dem gap-Gen befindet sich ein kurzer Sequenzabschnitt, der als RBS in Frage kommen könnte. Dafür spricht vor allem, daß fünf konsekutive Basen (GGAGG, Pos. 423-427) komplementär zum 3'-Ende einer 16S rRNS-Konsensus-Sequenz für methanogene Archaeobakterien (3'-UCCUCCACU-AGGUCGG-5'; Brown et al., 1989) sind. Die Sequenz der 16S rRNS von *M. fervidus* wurde bisher nicht publiziert.

1	GCTAAAAAATTTTGAATTGTACACACCTACTACTCCAAGAAATTTTGTAGTTATGACTGATGAATGTGTGTCTACTTCCATTGTGTAATATCAGATCCAAAAAT	111
	A K K I L N C T H P T T P R N F V L V N T D E H L L S L P F V N I T S K N	
	Sau3A	
112	AAATTGGAATTAAAAATGTATATTCATTAATTAATAATGATCTGAGCAATAATAACAAAAATGGCAATATTCGCTTGAATTTAGATGATAAGCATTGATTGTA	222
	K L D L K N V Y S I I K N G S E K I I N K N G K Y S L V I L D D K A L I V	
	Taq I	
223	AATAAAAATACAGATAATCTATATGTGAAGAGCTTTTCACAAATGAAATCGAAGTTTTCACAAAGTTTTGAATAAAGAAATAAAATATATGAAGTAATCTAA	333
	N K N Y R Y S I C V R A F S Q N K I E G F T K V F E N K R I K I Y E V I	
	Bsm I	
334	CCTAAAAATTAATATTAAGGACAAAAATTTTAAATTCAGGTCATAAAAATTAATACACATCTAAAAATAAAAATTTATTTTGGAGCAATCTATGAAGCTGT	444
	H K A V	4
445	AGCTATTAATGGGTATGGAAGTGTAGGTAAAGAGTTCAGATGCATTCACAAACAGATGATAGAAAGTTATCGGAGTAAGTAAGCAAGACAGCATTTCGAAGCTAG	555
5	A I N G Y G T V G K R V A D A I A Q O D D H K V I G V S K T R P D F E A R	41
556	GATGGCACTAAAAAGGGTTATGATTATATGTGTCTTCTGAAAGGGTAAATTTTGAAGGAGCAGGAATGAAGTTCGAGCAACAGTGGATGACATCTCATGA	666
42	M A L K K G Y D L Y V A I P E R V K L F E K A G I E V A G T V D D H L D E	78
667	AGCAGATATAGTATTGATTGTACTCAGAGGAATTTGGTCCAAAAATTTAAATGTATAAGAAAGGAATAAAGCTATATTCAAGGTGCAGAAAAATCATGAACA	777
79	A D I V I D C T P E G I G A K N L K H Y K E K G I K A I F Q G G E K H E D	115
	Hinf I	
778	TATAGGTTTATCAITCAATTCATGAGCAATTAAGCAATCTATGGCAAGCACTACACAGAGTGTGTTCTGTAAATCACTGGTTTATGCAGAACTTTAAACCAIT	888
116	I G L S F N S L S N Y E E S Y G K D Y T R V V S C N T T G L C R T L K P L	152
	Hinf I	
889	ACATGATTCTTTGGTATAAAAAAGTTAGAGCCGTAATAGTAAGGAGAGGTGCAGACCTGCACAAAGTATCTAAAGGACCTATAAAGCTATAATACCAATCCACCTAA	999
153	H D S F G I K K V R A V I V R R G A D P A Q V S K G P I N A I I P N P P K	189
1000	ATTACCATCTCACCATGGTCCAGATGTTAAACAGTCCTGGACATAAATAGATACAATGGCTGTATAGTACCACTACTTTAATGCATCAACATAACGTTATGGTACA	1110
190	L P S N H G P D V K T V L D I N I O T H A V I V P T T L N H Q N H V H V E	226
	Pst I	
1111	GGTGGAGAACTCTACTGTGGATGATATAAGATGTATTTGAAGATACGCTAGAGTTATACTTATAAGTGCTGAGGATGGTTGACATCAATGCAGAGATAATGGA	1221
227	V E E T P T V D D I I D V F E D T P R V I L I S A E D G L T S T A E I N E	263
	Sau3A	
	Hinf I	
222	ATATGCAAGGAATTAGGTACATCAGCAACGATTATTTGAATTCCTGTGGAGCAATCAATACTGCTGAGCAATGAATTTATTACATGCAAGCAGTTTCATCA	1332
264	Y A K E L G R S R N D L F E I P V H R E S I T V V D N E I Y Y M Q A V H Q	300
	Hinf I	
333	AGAATCAGATATAGTACCTGAAATGTAGATGCTGTAAGAGCAATATAGAGATGGAAGAGGATAAAACAAATCTATAAATAAACAAACAAAGCAATGAACATACITCA	1443
301	E S D I V P E N V D A V R A I L E M E E D K Y K S I N K T N K A M N I L Q	337
	Hinf I, Taq I	
444	ATAATAAGGAACCATGATTCAGTTGACCTGGACCACTGGCAACCTATAAGGTTATAAAGGAAGAGCTGTGTGACGTATTTGATTATTTAAAAATATAGGGCTTGATGCAATGA	1554
	H I R V G P A G N P I G Y K G K T V D V F D Y L K K L G L D A Y E	
555	ATATCAAGCTACATATGGTGAAGAATGGAAAAATCTTCTTTGTAAATGGAAAAATGCCAAAAAGAAATGATGCTCTGTATCTATACATGTCCTCTACTATATAA	1665
	Y Q A T Y G V R I G K K S S L L I G K N A K K N D V L V S I H A P Y Y I N	
	Pst I	
	Bsm I	
666	TTTATCTTCCAGATAAAGGAGTAATACAGAGTCCATAAATAGGTATTTCATTAAGAATAAGTTCCTGAATGGATCAATCC	1749
	L S S A D K G V I Q R S I N R L F I T S K V A E N H N	

Der GC-Gehalt im gap-Gen beträgt 34% und liegt damit im Bereich des GC-Gehalts für das Gesamtgenom von M. fervidus (33%; Stetter et al., 1981).

Neben der für die GAPDH kodierenden Region fanden sich Sequenzabschnitte, die für zwei weitere Proteine kodieren könnten. Die mit ORF-A und ORF-B gekennzeichneten Leserahmen überschreiten dabei beide den sequenzierten DNS-Bereich.

ORF-B beginnt dicht hinter dem gap-Gen (Start an Pos. 1457). Die abgeleitete Aminosäurefolge umfaßt 97 Reste; die Termination liegt außerhalb des sequenzierten DNS-Abschnitts. Der zweite ORF (ORF-A) befindet sich in der Stromaufwärts-Region des gap-Gens und wird ca. 100 bp vor diesem terminiert. Das Start-Codon dieses Leserahmens befindet sich außerhalb des sequenzierten Bereichs; der verbleibende Teil bis zur Termination (TAA-Codon, Pos. 331-333) umfaßt 330 bp und codiert für eine Kette von 110 AS-Resten.

Tabelle 2

Sequenzparameter zu zwei Strukturgenen und zwei ORFs von *M. fervidus*

	GC-Gehalt (%)	R/N/Y-Codons im Leseraster						G/nichtG/N-Codons im Leseraster					
		0		+1		+2		0		+1		+2	
		n*	%	n*	%	n*	%	n*	%	n*	%	n*	%
gap-Gen	34	106	32	35	10	95	28	112	33	37	11	16	5
ORF-A	24	33	30	12	11	28	25	18	16	9	8	8	7
ORF-B	32	28	29	14	14	22	23	23	24	11	11	10	10
pgk-Gen	31,7	113	28	48	12	103	25	116	30	51	12	22	5

* n = Gesamtzahl

Die Beobachtung, daß ORF-A und ORF-B einen deutlich höheren GC-Gehalt aufweisen, als er für die intergenischen Regionen von methanogenen Bakterien typisch ist (die intergenische Region zwischen ORF-A und dem gap-Gen hat z. B. einen GC-Gehalt von 17,5% und entspricht damit publizierten Werten; Hamilton und Reeve, 1985a, 1985b; Bollschweiler et al., 1985), deutet darauf hin, daß die offenen Leserahmen für reale Proteine kodieren (Tab. 2). Einen weiteren Hinweis dafür liefern bestimmte Triplet-Motive, die speziell proteinkodierende DNS-Sequenzen charakterisieren sollen (Shepherd, 1981; Trifonov, 1987). Die Regeln besagen, daß das Motiv "Purin/N/Pyrimidin" (R/N/Y) sowie "G/nichtG/N" in der funktionellen (kodierenden) Tripletfolge der Sequenz signifikant häufiger zu finden ist als in den beiden nichtfunktionellen Tripletfolgen nach Rasterverschiebung um ein bzw. zwei Nukleotide. Wie Tab. 2 zeigt, befolgen sowohl zwei reale *M. fervidus*-Gene (gap-Gen, pgk-Gen), als auch die beiden ORFs diese Regeln.

Schließlich wurde das Vorliegen einer RBS-ähnlichen Nukleotidfolge vor ORF-B (s. Abb. 11) als zusätzlicher Hinweis auf die in-vivo-Translation dieser Sequenz gewertet. Eine Homologiesuche in der MIPSX-Proteindatenbank des MPI (F. Pfeiffer; Februar 1989; Release 11.0; 19827 Entries) war allerdings für beide postulierten Genprodukte der ORFs nicht erfolgreich.

1.1.3 Sequenzvergleich der gap-Gene verschiedener Archaeobakterien

Der DNS-Bereich mit dem *M. fervidus*-gap-Gen wurde mit entsprechenden Sequenzen anderer Archaeobakterien (*Methanobacterium bryantii*, *Methanobacterium formicicum*; J. Biro, Dissertation 1989; *Pyrococcus woesei*; P. Zwickl, Diplomarbeit 1989) verglichen (Abb. 12). Wie ersichtlich, besitzen nur die Regionen der Gene selbst deutliche Ähnlichkeiten (vgl. Tab. 3 für Identitätswerte), nicht jedoch die übrigen Bereiche.

Abb. 12:

Vergleich von vier verschiedenen archaeobakteriellen gap-Gen-tragenden Nukleotidsequenzen.

Die kodierenden Bereiche für die gap-Gene sind in Großbuchstaben gezeigt, die flankierenden Abschnitte in Kleinbuchstaben. Identische Basen zwischen zwei Sequenzen werden durch den senkrechten Doppelstrich angezeigt. Punkte bezeichnen Lücken, die zur Optimierung des Alignments eingeführt wurden.

a: *P. woesei*; b: *M. fervidus*; c: *M. bryantii*; d: *M. formicicum*.

Tabelle 3

Nukleinsäureidentitäten (in %) zwischen den gap-Genen von 4 verschiedenen Archaeobakterien

	M. fervidus	M. formicicum	M. bryantii	P. woesei
Methanothermus fervidus	-			
Methanobacterium formicicum	71,5	-		
Methanobacterium bryantii	71,1	91	-	
Pyrococcus woesei	61,5	59,5	58,7	-

Eine gewisse Ausnahme davon machen nur die beiden Methanobacterium-Sequenzen, bei denen auch im Stromaufwärts-Bereich der gap-Gene eine starke Ähnlichkeit erhalten bleibt. Hier befindet sich allerdings jeweils ein ORF (vgl. J. Biro, Dissertation, 1989), der bei den anderen Sequenzen fehlt.

1.1.4 Aminosäuresequenz der M. fervidus GAPDH

Die aus der Nukleinsäuresequenz abgeleitete Aminosäurefolge für die M. fervidus GAPDH ist in Abb. 11 dargestellt. Demnach ist das Enzym aus 337 Aminosäureresten aufgebaut. Das errechnete Untereinheiten-Molekulargewicht von 37500 weicht damit deutlich von dem durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmten Wert (45000; Fabry und Hensel, 1987) ab. Eine Glycosylierung des Proteins konnte als Ursache für die zu geringe elektrophoretische Mobilität ausgeschlossen werden (Prof. Dr. H. König, Universität Ulm; pers. Mitteilung). Möglicherweise liegt der Diskrepanz zwischen errechnetem und bestimmtem Molekulargewicht ein ungewöhnliches Auffaltungsverhalten des Enzyms im SDS-haltigen Gel zugrunde.

Trotz dieser Unstimmigkeit kann davon ausgegangen werden, daß die aus der Nukleotidfolge des gap-Gens abgeleitete Sequenz mit der Primärstruktur der *M. fervidus*-GAPDH identisch ist:

(i) Die aus der Sequenz ableitbare Aminosäurezusammensetzung stimmt mit den aus der Aminosäure-Analyse des Proteins ermittelten Werten (Fabry, Diplomarbeit 1986) gut überein (Tab. 4).

(ii) Die abgeleitete Aminosäurefolge wird durch die Aminosäuresequenzen von allen 13 tryptischen Peptiden und durch die Sequenz des Protein-N-Terminus (Fabry und Hensel, 1987) bestätigt. Diese Peptidsequenzen decken insgesamt 127 Aminosäuren und damit mehr als ein Drittel der Gesamtsequenz ab (Abb. 11).

Tabelle 4

Aminosäurezusammensetzung der *M. fervidus*- GAPDH

Aminosäure	Mol% bestimmt durch Aminosäureanalyse	Mol% abgeleitet aus der Gensequenz
Ala	7,1	7,4
Arg	3,9	4,2
Asx	12,1	12,5
Cys	0,6-1,2	0,9
Glx	11,3	10,4
Gly	8,0	6,2
His	1,8	2,1
Ile	8,0	9,2
Leu	5,7	5,6
Lys	6,6	7,7
Met	2,7	3,6
Phe	2,0	2,1
Pro	5,0	4,8
Scr	5,4	4,4
Thr	6,1	5,5
Trp	0,1	0,3
Tyr	2,9	3,3
Val	10,0	9,8

1.1.5 Aminosäuresequenz-Vergleich mit anderen bekannten GAPDHs

Wie schon aufgrund des Nukleinsäure-Vergleichs (Abb. 12, Tab. 3) zu erwarten, besteht auch auf Proteinebene zwischen den archaeobakteriellen GAPDHs eine hohe Ähnlichkeit. Eine entsprechende Sequenzausrichtung bereitete daher keine große Mühe. Im Gegensatz dazu war das Alignment archaeobakterieller Sequenzen mit den bisher bekannten eubakteriellen und eukaryontischen GAPDHs (Herkunft und Literaturverweise s. Tab. 5) durch erhebliche Sequenzunterschiede erschwert. Eubakterielle und eukaryontische GAPDHs zeigen dagegen untereinander wieder eine relativ hohe Ähnlichkeit. Für die Ausrichtung der archaeobakteriellen Sequenzen an den eubakteriellen und eukaryontischen war die Verwendung computergestützter, sensitiver Alignmentprogramme (Gribskov et al., 1987; Argos, 1987) erforderlich. Das damit erzielte Alignment zeigt Abb. 13; in Tab. 6 werden die sich daraus ergebenden Ähnlichkeitswerte zusammengefaßt.

Um Hinweise darauf zu erhalten, inwieweit die Anordnung der Sekundärstrukturelemente in den archaeobakteriellen Enzymen eine deutlichere Entsprechung in den eubakteriellen und eukaryontischen Enzymen erkennen läßt als die Primärstruktur, wurden auf der Basis der Sequenzausrichtung Profile der physikalischen Parameter Hydropathie, Amphipathie und Kettenflexibilität für die entsprechenden Sequenzen erstellt und miteinander verglichen. Die Profile der genannten Parameter gelten als indikativ für α -Helices, β - und Loop-Strukturen: So sind Bereiche erhöhter Kettenflexibilität und niedriger Hydropathie-Werte charakteristisch für Loop-Strukturen, niedrige Kettenflexibilität- und höhere Hydropathie-Werte zeigen β -Strukturen an, während "Sägezahnkurven" in den Hydropathieprofilen sowie Maxima in den Amphipathieprofilen auf α -Helices hindeuten, deren Aminosäurereste teils dem Lösungsmittel zugewandt sind und teils mit β -Strukturen in Kontakt treten. Wie Abb. 14 zeigt, verlaufen die entsprechenden Profile für die M. fervidus-GAPDH und die gemittelten Profile für die M. bryantii- und M. formicicum-GAPDH bzw. für 17 verschiedene eubakterielle und eukaryontische GAPDHs weitgehend parallel. Daraus kann geschlossen werden, daß die Anordnung der Sekundärstrukturelemente von archaeobakteriellen und eubakteriellen/eukaryontischen Enzymen trotz der deutlichen Abweichung in der Primärstruktur sehr ähnlich ist. Die erarbeitete Sequenzausrichtung erhält damit eine zusätzliche Bestätigung.

Tabelle 5

Strukturdaten zu allen bisher beschriebenen GAPDHs

Reich		Herkunft	Literaturverweis zur Primärstruktur	Literaturverweis zur Raumstruktur
Eukaryonten	Wirbeltiere	Homo sapiens (Muskel)	Nowak et al., 1981	Watson und Campbell, Brookhaven Databank 1984 *
		Homo sapiens (Leber)	Arcari et al., 1984	n.b.
		Sus scrofa	Harris und Perham, 1968	n.b.
		Rattus norvegicus	Fort et al., 1985	n.b.
		Gallus gallus	Dugaiczyk et al., 1983	n.b.
	Wirbellose	Homarus americanus	Davidson et al., 1967	Behner et al., 1974
		Drosophila melanogaster (Isoenzym 1)	Tso et al., 1985	n.b.
		Drosophila melanogaster (Isoenzym 2)	Tso et al., 1985	n.b.
	Pflanzen	Caenorhabditis elegans	Yarbrough et al., 1987	n.b.
		Sinapis alba (Cytoplasma)	Martin und Cerff, 1986	n.b.
		Nicotiana tabacum (Cytoplasma)	Shih et al., 1986	n.b.
		Zea mays (Cytoplasma)	Brinkmann et al., 1987	n.b.
	Pilze	Saccharomyces cerevisiae (Isoenzym 1)	Holland und Holland, 1980	n.b.
		Saccharomyces cerevisiae (Isoenzym 2)	Holland und Holland, 1979	n.b.
		Saccharomyces cerevisiae (Isoenzym 3)	Holland et al., 1983	n.b.
		Aspergillus nidulans	Punt et al., 1988	n.b.
		Zygosaccharomyces rouxii	Imura et al., 1987	n.b.
		Ustilago maydis	Smith und Leong, submitted	n.b.
Eubakterien	Chloroplasten	Sinapis alba (Chloroplast)	Martin und Cerff, 1986	n.b.
		Nicotiana tabacum (Chloroplast, Unterein. A)	Shih et al., 1986	n.b.
		Nicotiana tabacum (Chloroplast, Unterein. B)	Shih et al., 1986	n.b.
		Zea mays (Chloroplast)	Brinkmann et al., 1987	n.b.
	Bakterien	Bacillus stearothermophilus	Branlant et al., 1989	Skarzynski et al. 1987
		Bacillus subtilis	Viaene und Dhase, 1989	n.b.
		Thermus aquaticus	Hocking und Harris, 1980	n.b.
		Escherichia coli	Branlant und Branlant, 1985	n.b.
		Zymomonas mobilis	Conway et al., 1987	n.b.
	Archaeobakterien	Methanobacterium bryantii	J. Biro, Dissertation 1989	n.b.
		Methanobacterium formicicum	J. Biro, Dissertation 1989	n.b.
		Pyrococcus woesei	P. Zwickl, Diplomarbeit 1989	n.b.
		Methanothermobacter fervidus	diese Arbeit	n.b.

* vgl. Bernstein et al., 1977

Tabelle 6

Ähnlichkeitswerte nach Dayhoff, 1978, (oberes Dreieck) und Identitäten in % (unteres Dreieck) zwischen den GAPDHs von Vertretern aller drei Urreiche.

	Homo sapiens	Sus scrofa	Gallus gallus	Homarus americ.	Drosophila mel.	Caenorhabditis	Saccharomyces	Sinapis alba	Ustilago maydis	Bacillus stearoth.	Thermus aquaticus	Zymomonas mob.	Nicotiana tab. Chl. A	Nicotiana tab. Chl. B	Escherichia coli	Methanothermus	Pyrococcus woesei	Methanob. formic.	Methanob. bryantii
Homo sapiens, Muskel	95,1	91,6	81,2	80,9	80,6	78,3	75,9	79,1	61,9	52,4	55,9	48,2	50,6	74,6	10,3	7,5	9,8	9,5	
Sus scrofa	92,6	-	95,6	80,8	81,7	82,1	77,3	76,0	79,9	63,4	52,4	56,6	49,4	51,8	75,4	10,4	7,9	9,7	9,3
Gallus gallus	87,2	92,3	-	81,9	82,6	84,4	77,7	76,9	80,7	63,3	52,3	57,0	49,2	51,6	75,7	10,7	7,3	9,5	9,2
Homarus americanus	73,2	73,8	75,8	-	85,5	78,5	76,4	74,5	80,6	59,6	52,3	55,9	48,9	51,3	74,3	12,4	7,3	10,3	9,9
Drosophila melanogaster, (Isoenzym 1)	72,1	75,2	77,5	77,9	-	84,0	76,6	75,2	83,5	62,0	54,9	56,5	50,2	51,2	76,8	11,8	8,4	12,0	11,9
Caenorhabditis elegans	71,5	74,8	78,9	72,5	75,5	-	78,1	75,5	77,6	64,2	57,6	56,7	50,6	53,5	74,8	13,3	8,4	10,5	10,3
Saccharomyces cerevisiae, (Isoenzym 2)	65,8	66,4	67,8	67,8	64,1	68,5	-	76,2	73,5	63,9	57,0	60,1	51,1	54,0	77,3	11,3	9,0	9,7	9,1
Sinapis alba (Cytoplasma)	67,4	67,4	68,8	70,1	68,5	70,5	69,1	-	74,9	48,0	54,1	56,1	51,3	55,0	72,0	11,2	9,5	11,7	11,3
Ustilago maydis	71,1	72,8	74,8	73,8	74,8	71,8	65,8	68,1	-	62,4	54,8	54,1	52,0	52,7	75,8	11,3	7,7	11,2	11,1
Bacillus stearothermophilus	53,4	55,0	56,7	54,4	55,7	55,7	55,7	51,3	54,7	-	66,4	64,2	62,0	64,1	67,9	13,9	9,3	10,9	11,7
Thermus aquaticus	47,3	48,7	49,3	48,3	47,7	50,0	50,7	47,0	49,0	59,7	-	56,9	52,9	56,8	56,6	12,9	9,3	10,0	10,5
Zymomonas mobilis	47,7	49,3	50,3	49,3	49,0	50,3	52,7	48,7	46,3	58,8	50,3	-	58,2	55,7	56,2	11,9	6,5	11,5	10,6
Nicotiana tabacum, Chloroplast (Untereinheit A)	44,3	46,9	45,6	45,0	47,7	46,3	47,0	45,3	46,0	57,4	49,3	50,3	-	86,3	52,2	12,6	7,5	8,3	9,1
Nicotiana tabacum, Chloroplast (Untereinheit B)	45,0	46,6	47,0	47,3	47,0	49,0	49,0	47,3	45,6	59,4	50,3	51,3	80,9	-	55,8	12,8	8,0	9,6	10,2
Escherichia coli	66,1	67,4	69,1	65,8	67,4	67,4	69,5	66,4	68,5	59,1	49,0	49,0	47,0	48,3	-	14,8	11,9	12,4	12,8
Methanothermus fervidus	18,5	19,8	20,1	20,5	19,5	21,1	20,5	19,5	19,1	20,5	19,1	17,8	19,1	18,5	20,5	-	62,9	80,3	81,0
Pyrococcus woesei	15,8	17,4	17,1	18,1	18,5	17,8	18,5	18,5	16,4	17,8	15,1	13,8	14,4	15,1	21,5	55,4	-	62,4	63,0
Methanobacterium formicicum	18,5	19,1	18,8	18,8	20,1	20,1	17,8	19,8	19,1	19,5	15,4	16,4	15,1	17,4	20,5	70,5	56,7	-	97,4
Methanobacterium bryantii	18,5	18,8	18,5	18,5	18,8	18,8	19,1	19,5	19,1	19,1	15,4	16,1	15,1	17,4	20,5	71,1	57,7	95,3	-

Abb. 13 (S. 65):

Alignment von 13 verschiedenen GAPDH-Sequenzen.

In der obersten Zeile sind die Elemente einer Konsensus-Sekundärstruktur (CONS-SEC-ST) aus drei GAPDHs (Homo sapiens, Muskel; Homarus americanus, Muskel; Bacillus stearothermophilus) angegeben: H oder h bezeichnet eine α -Helix, S oder s ein β -Faltblatt; unterstrichene Großbuchstaben bedeuten Konservierung des entsprechenden Elements in allen drei Sequenzen, Großbuchstaben Konservierung in zwei GAPDHs und Kleinbuchstaben das Vorkommen des Elements in nur einer Sequenz. Alle Bereiche, die weder die Kriterien für eine α -Helix noch für eine β -Struktur erfüllen, sind mit Bindestrichen gekennzeichnet. Die zur Optimierung der Sequenzausrichtung eingeführten Lücken in die Sequenzen werden durch Punkte dargestellt.

Die Abkürzungen bedeuten:

HsM: H. sapiens, Muskel; HaM: H. americanus, Muskel; Ce: Caenorhabditis elegans; Zm: Zymomonas mobilis; Bsu: Bacillus subtilis; Bst: B. stearothermophilus; Taq: Thermus aquaticus; NtC-B-: Nicotiana tabacum, Chloroplast, Untereinheit B; MbF: Methanobacterium formicicum; Mbb: Methanobacterium bryantii; Pw: Pyrococcus woesei; Mtf: M. fervidus

Abb. 14 (S. 66):

Hydrophathie- (A), Amphipathie- (B) und Flexibilitätsprofile der GAPDHs von M. fervidus (gepunktete Linien) im Vergleich mit dem Durchschnittsprofil der GAPDHs von M. bryantii und M. formicicum (gestrichelte Linien) sowie einem Durchschnittsprofil aus 17 verschiedenen eubakteriellen und eukaryontischen GAPDHs (durchgezogene Linien).

Zur Vermeidung von Überlappungen sind die M. fervidus-Profile um jeweils 0,7 Einheiten (bei Hydrophathie), 0,8 Einheiten (bei Amphipathie) und 0,1 Einheiten (bei Flexibilität) herabgesetzt. Lücken in den Kurvenführungen zeigen entsprechende Lücken im Alignment (vgl. Abb. 13) an.

Für das Durchschnittsprofil wurden die folgenden GAPDHs berücksichtigt:

H. sapiens, Muskel; Sus scrofa; Rattus norvegicus; Gallus gallus; H. americanus, Muskel; Drosophila melanogaster, Isoenzym 1; C. elegans; Saccharomyces cerevisiae, Isoenzym 2; Zygosaccharomyces rouxii; Sinapis alba, Cytoplasma; Nicotiana tabacum, Cytoplasma; E. coli; B. stearothermophilus; T. aquaticus; Zymomonas mobilis; Nicotiana tabacum, Chloroplast Untereinheit A und Untereinheit B.

CONS-SEC-ST-ssSSSS--hhHHHHHHHHHH--..ssSSSSsS--..HHHHHHHHss--ss--SSSS--SSSS--..SSSSSS-----

1 20 40 60 80 100

HsM ... GKVKVGVDFGRIGRLVTRAAAFSGK...VDVAINDPFIDLIIYMYMFQYDSTHGKFGHTVKAEDGKLVLD...GKAITFQERDOPENIKMGDAG
 HaM ... SKIGIHGFGRIQLVLRALSCG...AQVAVNDPFIAL EYMYMFQYDSTHGKFGHEKMGDGLVD...GKKTIVFLNMTTVAHATATQKT
 Ce ... MSKANHVGNGFRIQLVLRAAVEKDT...VQVAVNDPFIITIDYMYLFKYDSTHGFGKGTYYDGLFIVQKQGSXHKIKVFNKSPAAIANGSVK
 Sa MADKKIKITIGINGFRIQLVLRVILQMD...VELVAVNDPFIIT EYNTYMFKYDSVHGQWKH.MLKVKDEKTLFF...GEKPVTVFGIRNPDIPHGEAG
 Zm ... AVKVAINGFRIQLVLRALSRPQSLGLVITND...LGSVGNALFKRDSAHGTYPGTVTTEGNDPVID...GKKIVVTAERDPAHLPHKGLG
 Bst ... HAVKVGINGFRIQLVLRVRAALNPPE...VEVVAVND.LTDANMLAHLQDTSVHGKLDAEVSDGNLNVN...GKTI EYSAERPAKGLSWGKQG
 Taq ... AVKVGINGFRIQLVLRVRAALNPPE...VEVVAVND.LTDANMLAHLQDTSVHGKLDAEVSDGNLNVN...GKTI EYSAERDPEMLANGEIG
 MtC-B- ... KLVKVAINGFRIQLVLRVRAALNPPE...VEVVAVND.LTDANMLAHLQDTSVHGKLDAEVSDGNLNVN...GKTI EYSAERDPEMLANGEIG
 Hbb ... PKSV.VGINGYGTIGKRVADAVSAQDD...MKIVGVTKRSPDEFARNAVEKGYDLYI SAPERESFEEAGIKV...TGTADELFEK...
 Pw ... PKSV.VGINGYGTIGKRVADAVSAQDD...MKIVGVTKRSPDEFARNAVEKGYDLYI SAPERESFEEAGIKV...TGTADELFEK...
 MtF ... PKA.VAINGYGTIGKRVADAVSAQDD...MKIVGVTKRSPDEFARNAVEKGYDLYI SAPERESFEEAGIKV...TGTADELFEK...

CONS-SEC-ST --SSSS-----HHHHH.HHHHH--SSSSSS--ss-----SSSS--HHHHHHHHHHHHHH--sSSSSSSSSSS--

120 140 160 180 200

HsM TAYVVESTGVFTTMEKAG.AHLKGGAARIVISAPSA...DAPMFVGVNHFKYANSL.KIISNASCTTNCLAPLKVITHDFGIVEGLMTTVAHATATQKT
 HaM AEYIVVESTGVFTTMEKAS.AHFKGGAKKVVISAPSA...DAPMFVGVNLEKYSKDH.TVVSNASCTTNCLAPLKVITHDFGIVEGLMTTVAHATATQKT
 Ce ADFVVESTGVFTTMEKAS.AHLKGGAARIVISAPSA...DAPMFVGVNHEKYDASHHVSNASCTTNCLAPLKVITHDFGIVEGLMTTVAHATATQKT
 Sa ADFVVESTGVFTTMEKAA.AHLKGGAARIVISAPSA...DAPMFVGVNHEKYDASHHVSNASCTTNCLAPLKVITHDFGIVEGLMTTVAHATATQKT
 Zm VDVIEMCTGIFTMEKAS.AHLTAGAKKVLISAPAKGDVDRTVVGVNHKGLTADO.KIVSNASCTTNCLAPLKVITHDFGIVEGLMTTVAHATATQKT
 Bst VEIVVESTGVFTTMEKADAA.KHLEAGAKKVLISAPAK.NEDITVHGVNDEQYDAAHNDVINSNASCTTNCLAPLKVITHDFGIVEGLMTTVAHATATQKT
 Taq VGVVVESTGVFTTMEKADAA.KHLEAGAKKVLISAPAK.NEDITVHGVNDEQYDAAHNDVINSNASCTTNCLAPLKVITHDFGIVEGLMTTVAHATATQKT
 MtC-B- LDIVIEGTGVFTTMEKAG.AHLKGGAARIVISAPAK.GADIPYVGVNHEQYDAAHNDVINSNASCTTNCLAPLKVITHDFGIVEGLMTTVAHATATQKT
 Hbb LDIVIEGTGVFTTMEKAG.AHLKGGAARIVISAPAK.GADIPYVGVNHEQYDAAHNDVINSNASCTTNCLAPLKVITHDFGIVEGLMTTVAHATATQKT
 Pw LDIVIEGTGVFTTMEKAG.AHLKGGAARIVISAPAK.GADIPYVGVNHEQYDAAHNDVINSNASCTTNCLAPLKVITHDFGIVEGLMTTVAHATATQKT
 MtF LDIVIEGTGVFTTMEKAG.AHLKGGAARIVISAPAK.GADIPYVGVNHEQYDAAHNDVINSNASCTTNCLAPLKVITHDFGIVEGLMTTVAHATATQKT

CONS-SEC-ST -----SS.SS--HHHHHHHH--SSSSSSSS--SSSSSSSS--..HHHHHHHHHHHH..hh--SSSS-----

220 240 260 280 300

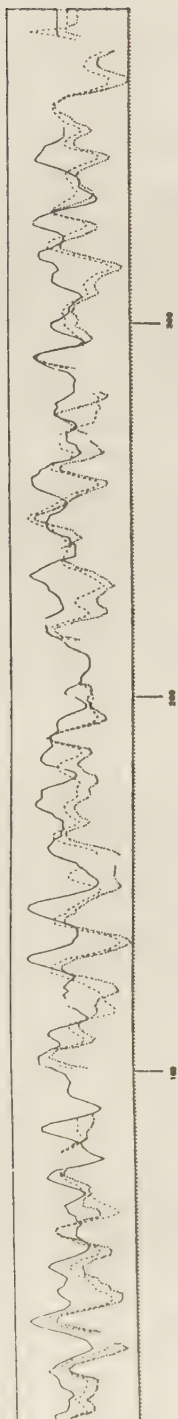
HsM VDPSGKLVRGGRGAAGNITP.ASTGAAKAVGVPIPEL.DGKLTGMARVPTAMVSVLDLTCRLEKPAK.YDDIKKVVKEASE.GPLKGLGYTEDDEVVS
 HaM VDPSGKLVRGGRGAAGNITP.ASTGAAKAVGVPIPEL.DGKLTGMARVPTAMVSVLDLTCRLEKPAK.YDDIKKVVKEASE.GPLKGLGYTEDDEVVS
 Ce VDPSGKLVRGGRGAAGNITP.ASTGAAKAVGVPIPEL.DGKLTGMARVPTAMVSVLDLTCRLEKPAK.YDDIKKVVKEASE.GPLKGLGYTEDDEVVS
 Sa VDPSGKLVRGGRGAAGNITP.ASTGAAKAVGVPIPEL.DGKLTGMARVPTAMVSVLDLTCRLEKPAK.YDDIKKVVKEASE.GPLKGLGYTEDDEVVS
 Zm LDQI.HSDLRARATASAMPT.TSTGAARAVLPIPEL.KGKLDGIRVPTAMVSVLDLTCRLEKPAK.YDDIKKVVKEASE.GPLKGLGYTEDDEVVS
 Bst LDLP.HKDLRRARAAAEIIP.TTTGAAKAVLPIPEL.KGKLDGIRVPTAMVSVLDLTCRLEKPAK.YDDIKKVVKEASE.GPLKGLGYTEDDEVVS
 Taq LDLP.HKDLRRARAAAEIIP.TTTGAAKAVLPIPEL.KGKLDGIRVPTAMVSVLDLTCRLEKPAK.YDDIKKVVKEASE.GPLKGLGYTEDDEVVS
 MtC-B- LDLP.HKDLRRARAAAEIIP.TTTGAAKAVLPIPEL.KGKLDGIRVPTAMVSVLDLTCRLEKPAK.YDDIKKVVKEASE.GPLKGLGYTEDDEVVS
 Hbb LDLP.HKDLRRARAAAEIIP.TTTGAAKAVLPIPEL.KGKLDGIRVPTAMVSVLDLTCRLEKPAK.YDDIKKVVKEASE.GPLKGLGYTEDDEVVS
 Pw LDLP.HKDLRRARAAAEIIP.TTTGAAKAVLPIPEL.KGKLDGIRVPTAMVSVLDLTCRLEKPAK.YDDIKKVVKEASE.GPLKGLGYTEDDEVVS
 MtF LDLP.HKDLRRARAAAEIIP.TTTGAAKAVLPIPEL.KGKLDGIRVPTAMVSVLDLTCRLEKPAK.YDDIKKVVKEASE.GPLKGLGYTEDDEVVS

CONS-SEC-ST -----SSSS--SSSS--SSSSSSss--HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH--

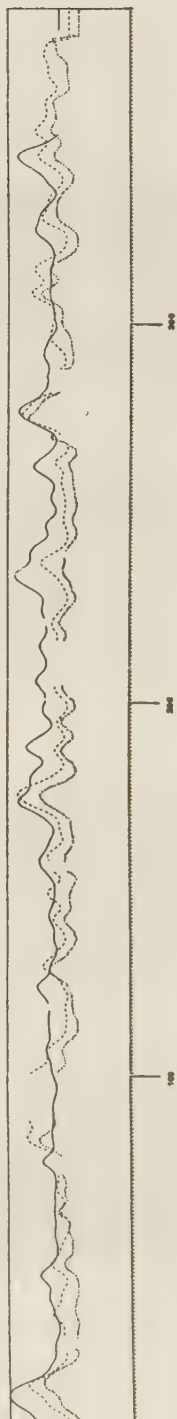
320 340 360 380 399

HsM DDFNGSHSSIFDAGAGIELNDTFVKLVSHYDNEFGYSRRVVDLMAHMASKE...
 HaM SDFIGNSSSIFDAGAGIELNDTFVKLVSHYDNEFGYSRRVVDLMAHMASKE...
 Ce TDFVSDPHSSIFDAGAGIELNDTFVKLVSHYDNEFGYSRRVVDLMAHMASKE...
 Sa TDFVSDPHSSIFDAGAGIELNDTFVKLVSHYDNEFGYSRRVVDLMAHMASKE...
 Zm RDFVSDPHSSIFDAGAGIELNDTFVKLVSHYDNEFGYSRRVVDLMAHMASKE...
 Bst DYNGNKSSTSIDALSTHMGSSMKVKI.SYDNEFGYSRRVVDLMAHMASKE...
 Taq RDYNGNKSSTSIDALSTHMGSSMKVKI.SYDNEFGYSRRVVDLMAHMASKE...
 MtC-B- VDFRCSDDYSIDSLSTHMGSSMKVKI.SYDNEFGYSRRVVDLMAHMASKE...
 Hbb TAEFMEYAKELGRSNDLFEIGVMEELSLNDVGLYEQYAAIHQESDVPPEVNDIARAMEHNDPSSIKTKNKAMGIL...
 Pw TAGFMEYAKELGRSNDLFEIGVMEELSLNDVGLYEQYAAIHQESDVPPEVNDIARAMEHNDPSSIKTKNKAMGIL...
 MtF TAGFMEYAKELGRSNDLFEIGVMEELSLNDVGLYEQYAAIHQESDVPPEVNDIARAMEHNDPSSIKTKNKAMGIL...

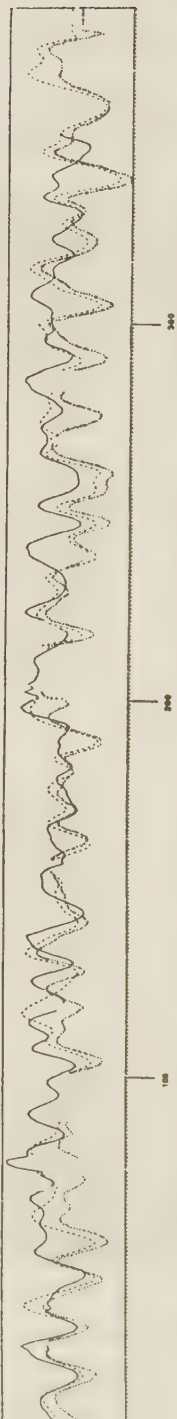
A



B



C



Mit dem Vorliegen homologer archaeobakterieller GAPDH-Sequenzen von nahe verwandten Organismen mit Temperaturoptima aus dem meso- bis ultrathermophilen Bereich (*M. bryantii* und *M. formicicum*: 37 °C; *M. fervidus*: 83 °C; *P. woesei*: 100 °C) bot sich auch ein Strukturvergleich unter dem Aspekt der Thermoadaptation an (Abb. 15).

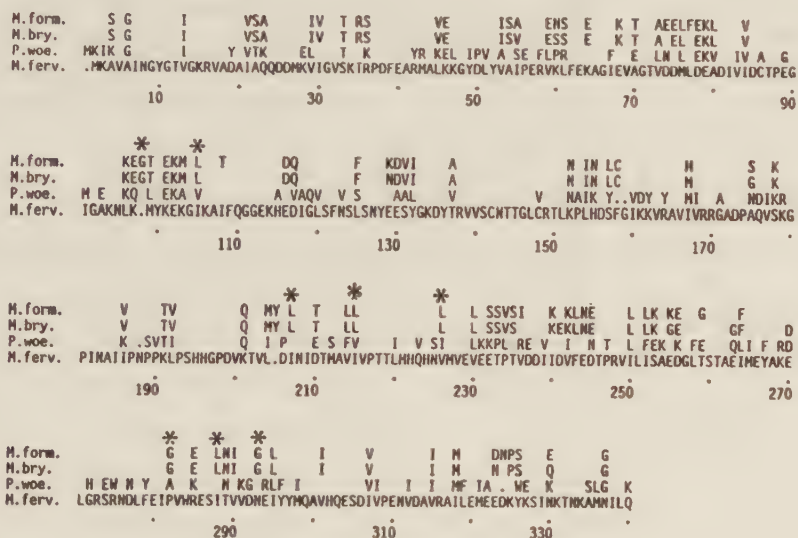


Abb. 15:

Sequenzvergleich zwischen vier archaeobakteriellen GAPDHs.

Die Sequenz der *M. fervidus*-GAPDH (M.ferv.) ist vollständig ausgeschrieben. Bei den GAPDHs von *M. bryantii* (M.bry.) *M. formicicum* (M.form.) und *P. woesei* (P.woe.) sind nur die von der *M. fervidus*-Sequenz abweichenden Aminosäurereste angegeben. Die zur Optimierung der Ausrichtung eingefügten Lücken sind als Punkte innerhalb der Sequenzen gekennzeichnet. Positionen, an denen sich die beiden thermophilen GAPDHs (M.ferv, P. woe.) durch eine Bevorzugung sperrigerer bzw. voluminöserer Reste gegenüber den mesophilen GAPDHs konform verhalten, sind mit einem Stern bezeichnet.

Tabelle 7

Aminosäureaustausche zwischen der *M. fervidus* GAPDH und der *M. bryantii*-GAPDH

	<i>M. fervidus</i>	Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Gln	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val
<i>M. bryantii</i>																				
Ala						1												1		1
Arg								3		1								1		
Asn								3					1					1		
Asp																				
Cys															1					
Gln				1	1								1							
Glu				5									3							1
Gly		2		2			2						1			1				
His																				
Ile																				
Leu		1									7	1		1	1		1		1	6
Lys								3			1	1					2			3
Met												2	1	1						1
Phe											1	1	1							
Pro																				
Ser		3	1					1				1	1	1				2		1
Thr		1		1													1			
Tyr																				
Val											6	2				1	1			

Obwohl einer eingehenden Diskussion der beobachteten Sequenzunterschiede zwischen den GAPDHs aus verschiedenen Archaeobakterien nicht vorgegriffen werden soll, ist es für das Verständnis der durchgeführten Mutagenese-Experimente wichtig, schon hier auf einige auffallende Unterschiede zwischen den ansonsten sehr ähnlichen Primärstrukturen der GAPDHs des mesophilen M. bryantii und des thermophilen M. fervidus hinzuweisen. In Tab. 7 sind die Aminosäureaustausche zwischen den GAPDH-Sequenzen von M. fervidus und M. bryantii dargestellt, die sich aus einem entsprechenden Sequenzvergleich ergeben. Da mit 95% Aminosäure-Identität die Ähnlichkeit zwischen den beiden mesophilen archaeobakteriellen GAPDHs so groß ist, daß aus einem Vergleich zwischen M. fervidus und M. formicicum keine zusätzlichen Informationen erwartet werden können, wurde auf die zweite Gegenüberstellung verzichtet.

Tabelle 8

Unterschied in der Aminosäurezusammensetzung und bevorzugte Netto-Austausche zwischen den GAPDHs von M. fervidus und M. bryantii

Unterschied zwischen "heiß" gegenüber "kalt"		Bevorzugte Netto-Austausche von "kalt" nach "heiß"	
Ile	+9		
Ala, Asp	+4		
Lys, Val	+2	Leu-Ile	6
Arg, Glu	+1	Ser-Ala	3
His, Pro	+1	Asn-Glu	3
Tyr	+1	Glu-Asp	2
Phe, Thr	0	Gly-Ala	2
Trp	0	Gly-Asn	2
Cys, Gln	-1	Gly-Glu	2
Met	-2	Met-Ile	2
Asn	-3		
Ser	-5		
Leu	-7		
Gly	-8		

Der Sequenzvergleich zwischen dem M. fervidus- und dem M. bryantii-Enzym zeigt auffallende Unterschiede im Ile- und Gly-Anteil: Ile wird im thermophilen Protein deutlich bevorzugt, Gly dagegen vermieden. Ile vertritt im thermophilen Enzym dabei häufig die Position von Leu, während Gly durch mehrere verschiedene Aminosäurereste ohne deutliche Präferenz (Ala, Asn, Glu) ersetzt wird (vgl. Tab. 8). An einer Position (Pos. 98 in Abb. 15) wird Gly aus der thermophilen Sequenz sogar eliminiert. Somit lag der Verdacht nahe, daß der Eintausch größerer, sperrigerer Reste gegen kleine ein Thermophilie-spezifisches Merkmal darstellt. Wie Abb. 15 zeigt, bestätigt sich diese Tendenz auch nach Berücksichtigung der GAPDH des ultrathermophilen P. woesei: An 8 Positionen (Pos. 98, 105, 207, 215, 226, 282, 288 und 293) läßt der Sequenzvergleich eine Bevorzugung der sperrigen Aminosäurereste Ile bzw. Val gegenüber Leu oder eine Vermeidung von Gly bei den thermophilen GAPDHs erkennen.

1.2 Expression der M. fervidus-GAPDH in E. coli

Eine wesentliche Voraussetzung für vertiefte Struktur-Funktionsuntersuchungen an der M. fervidus-GAPDH war die Etablierung eines heterologen Expressionssystem für das gap-Gen. Aus gentechnischen und präparativen Gründen bot sich E. coli als Wirtsorganismus an: Hier standen einerseits ausgeklügelte Expressionsvektoren und Mutantenstämme für die heterologe Genexpression zur Verfügung, und andererseits versprach die Expression eines thermostabilen Proteins in einem mesophilen Bakterium auch erhebliche Vorteile bei der Reinigung des Produktes.

Als Expressionsvektor wurde pJF118EH (vgl. Abb. 5) gewählt, der durch das Vorliegen des starken, synthetischen tac-Promotors (Brosius und Holy, 1984) eine hohe Expressionsrate erwarten ließ. Dieser Promotor steht unter der Kontrolle des plasmidkodierten lac-Repressors und kann durch IPTG dereprimiert werden.

Abb. 16:
Schematisches Fließdiagramm zur Konstruktion des Expressionsplasmids pJFgap-1.
Bei der Darstellung kurzer, aber für die Konstruktion wichtiger DNS-Abschnitte wurde auf eine proportionale Wiedergabe verzichtet.

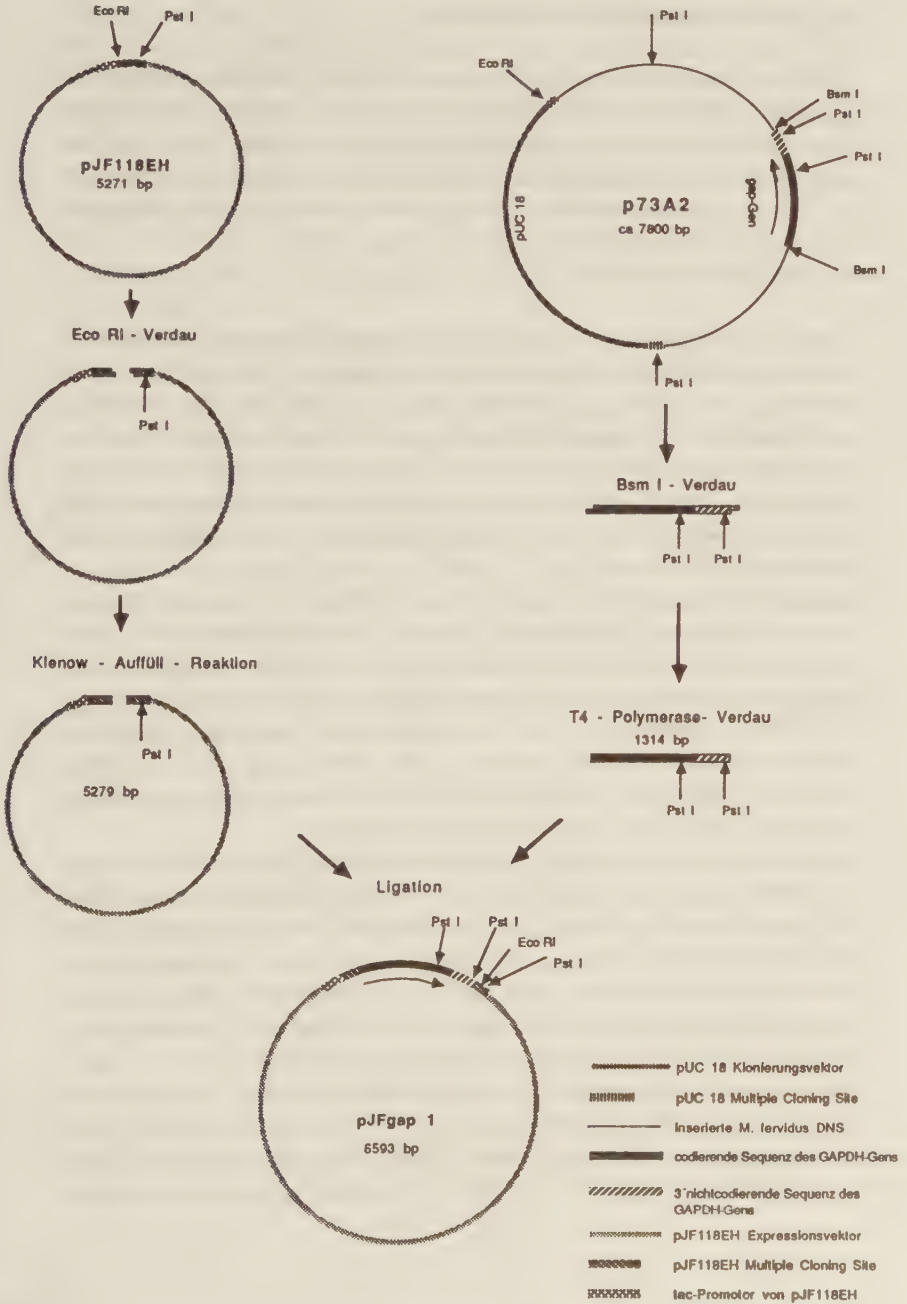


Abb. 16

1.2.1 Konstruktion des Expressionsplasmids

An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, daß alle genannten Plasmidkonstruktionen in Diagrammen schematisch mitverfolgt werden können. Darüberhinaus sind im Anhang Abbildungen zu finden, die für das Verständnis der einzelnen Rekombinationsschritte wichtige Sequenzen im Detail zeigen und damit für einen Interessenten eine vertiefte Dokumentation des Konstruktionsablaufes bieten. Im Text wird stets auf beide Abbildungen verwiesen.

Mit Blick auf die angestrebten Strukturanalysen erschien es wichtig, ein unfusioniertes Genprodukt in E. coli zu erhalten. Daher wurde bei der Konstruktion des Expressionsplasmids (Abb. 16 und Anh. Abb. A) versucht, das archaebakterielle Gen mit seinem eigenen Translationsstartcodon hinter der RBS des Vektors einzufügen. Die im gap-Gen unmittelbar vor dem ATG vorhandene Bsm I-Schnittstelle erleichterte dieses Vorhaben sehr und erlaubte bei der Konstruktion die Einhaltung einer Distanz von nur 8 bp zwischen ATG und der RBS.

Ausgehend vom rekombinierten Genbank-Plasmid 73A2, das das gap-Gen in einem chromosomalen 5,1-kb-Fragment enthielt, wurde zunächst mit Hilfe von Bsm I ein 1,3-kb-Subfragment gewonnen, in dem die Stromaufwärts-Gensequenz vollständig und die Stromabwärts-Region zu einem großen Teil (es verblieben nur noch rund 300 bp) eliminiert war. Nach Entfernung der Einzelstrang-Enden wurde das Fragment in den Expressionsvektor pJF118EH einligiert. Dieser wurde dazu vorher mit Eco RI linearisiert und an den überstehenden Enden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt.

Da angenommen werden konnte, daß eine günstige Positionierung eines Leserahmens hinter den tac-Promotor zu einer starken Expression des einligierten Gens führen würde, die das Wachstum der Zelle beeinträchtigt, bot es sich an, eine nach IPTG-Zugabe beobachtbare Wachstums hemmung der Kultur als ersten Hinweis auf die Expressionsfähigkeit entsprechender Klone zu werten (vgl. Abb. 6 und Punkt 2.1.6.2 in Material und Methoden). Tatsächlich zeigten von 350 untersuchten Transformanten 17 nach IPTG-Induktion entweder deutlich reduziertes oder ganz unterdrücktes Wachstum auf dem Nähragar, während sie auf den Kontrollplatten ohne IPTG problemlos wuchsen. Davon hatten drei (EX-B4, EX-D5 und EX-D6; bei ihnen war das Wachstum in Gegenwart von IPTG ganz unterdrückt) das erwartete

Plasmid, und einer (EX-H4; er zeigte nur reduziertes Wachstum) ein Plasmid mit einem falsch orientierten Insert. Dies entspricht einer Ausbeute von 0,85% Expressionsklonen in bezug auf die Gesamtzahl aller Transformanten. Dieser geringe Anteil war wohl auf die hohe Religationsrate des Vektor zurückzuführen.

Die Expressionsplasmide erhielten die Bezeichnung pJFgap-1. Sie umfaßten eine Größe von 6592 bp und ihre Sequenz war vollständig bekannt.

1.2.2 Expression des M. fervidus-gap-Gens mit pJFgap-1

In einem Vorversuch wurden Zellen von EX-B4, EX-D5 und EX-D6 aus je 1 Liter Kultur bei $OD_{578}=0,5$ mit 1 mM IPTG 30 min induziert und abgeerntet. Um die Expression des M. fervidus-gap-Gens in E. coli JM 83 qualitativ bestimmen zu können, wurde die E. coli-eigene GAPDH durch Hitzeinkubation (75 °C, 30 min) sowie durch Zugabe von Pentalenolaktone zum Rohextrakt inaktiviert. Pentalenolaktone (eine antibiotische Substanz aus Streptomyces arenae) wirkt hemmend auf fast alle eubakteriellen und eukaryontischen GAPDHs (Mann und Mecke, 1979), wohingegen archaebakterielle GAPDHs im allgemeinen resistent sind (Fabry und Hensel, 1987; J. Lang, Diplomarbeit 1986).

Von den drei Klonen zeigten zwei (EX-D5 und EX-D6) eine deutliche M. fervidus-GAPDH-Aktivität. Einer der Klone (EX-D6) wurde daraufhin für weitere Untersuchungen herangezogen (s.u.)

1.2.3 Optimierungsversuche zur Expressionsinduktion durch IPTG

Nachdem im Vorversuch die Expression der archaebakteriellen GAPDH nachgewiesen worden war, galt das weitere Bestreben der Optimierung der Enzym-Ausbeute.

Zunächst wurde der Einfluß der Induktorkonzentration auf das Zellwachstum genauer untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß Flüssigkulturen nach Zugabe von 1 - 5 mM IPTG eine deutlich geringere Wachstumshemmung zeigten, als es die Differenzierungstests auf IPTG-haltigen festen Nährböden erwarten ließen (Abb. 17). Offensichtlich führen erst extrem hohe IPTG-Konzentrationen (7 mg IPTG entspricht ca. 30 mM auf der Plattenoberfläche) zu einer durch die Überproduktion an Fremd-Protein bedingten Wachstumseinstellung.

Der Versuch zeigte damit indirekt auch an, daß eine starke Erhöhung der Expressionsrate nur durch eine wirtschaftlich kaum zu vertretende Erhöhung der IPTG-Konzentration (über 5 mM) erreicht werden kann. Alle weiteren Experimente wurden in Gegenwart von 1 mM IPTG durchgeführt.

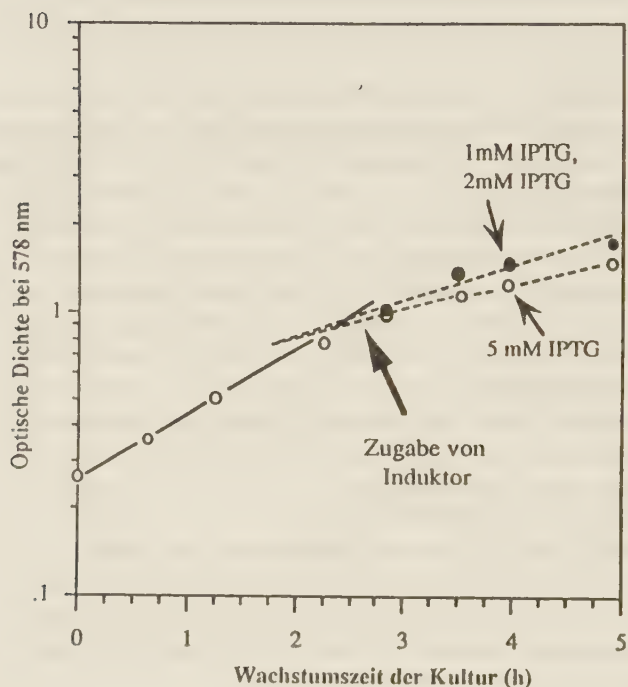


Abb. 17:
Wachstumsbeeinflussung des Expressionsklons EX-D6 durch IPTG.

Um festzustellen, in welchem Stadium der Wachstumsphase die Induktion zur besten GAPDH-Ausbeute führt, wurden EX-D6-Kulturen bis zur optischen Dichte von 0,5, 0,8, 1,0, 1,2 oder 1,5 angezogen, mit 1 mM IPTG induziert und nach 30 min Inkubation abgeerntet. Wie aus Abb. 18 zu ersehen, liegt der effektivste Zeitpunkt zur Expressionsinduktion am Ende der logarithmischen Wachstumsphase bei einer optischen Dichte von 1,2.

Die optimale Induktionsdauer für die Expression wurde nach Abernten von 1-Liter-Aliquots aus einer induzierten 10-Liter-Kultur zu unterschiedlichen Zeiten und anschließender Messung der Aktivität der exprimierten *M. fervidus*-GAPDH bestimmt. Wie in Abb. 19 dargestellt, ist das Maximum der Gesamtaktivität und der spezifischen Aktivität nach ca. 4-5 h erreicht.

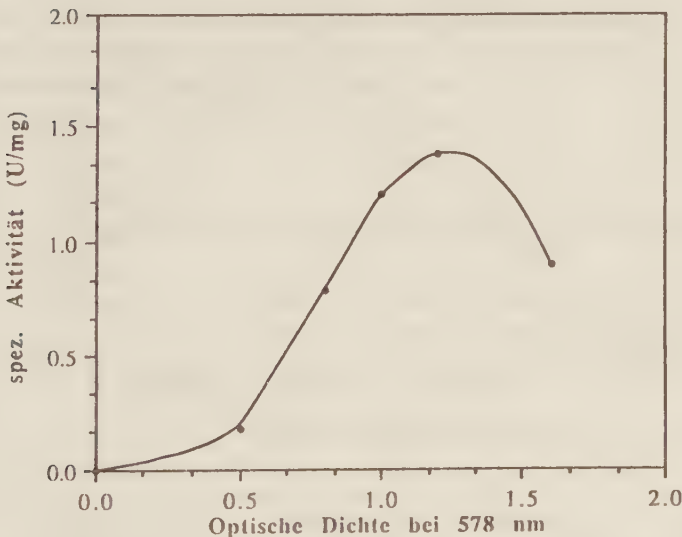


Abb. 18:
Abhängigkeit der Expression der *M. fervidus*-GAPDH in Klon EX-D6 von der Wachstumsphase, in der die Induktion erfolgte (IPTG-Konzentration jeweils 1 mM).

1.2.4 Induktionsversuche mit Laktose

Der Leistungsvergleich zwischen IPTG (1 mM) und Laktose (2 mM) wurde sowohl in Vollmedium als auch in Minimalmedium mit Glycerin (1%) als C-Quelle (zur Verhinderung etwaiger Katabolit-Repression des lac-Operons) durchgeführt. In Vollmedium betrug die unter Laktose-Induktion erzielte Enzymausbeute nur 1/250 der IPTG-Kontrolle. Für den Vergleich in Minimalmedium wurde *E. coli* WK6 mit pJFgap-1 transformiert, auf Thiamin-supplementiertem Minimalmedium angezogen und mit Laktose bzw. IPTG induziert. Unter diesen Bedingungen war die Laktoseinduktion zwar effizienter, betrug aber immer noch nur 1/10 der IPTG-Kontrolle und kam somit als alternatives Verfahren nicht in Betracht.

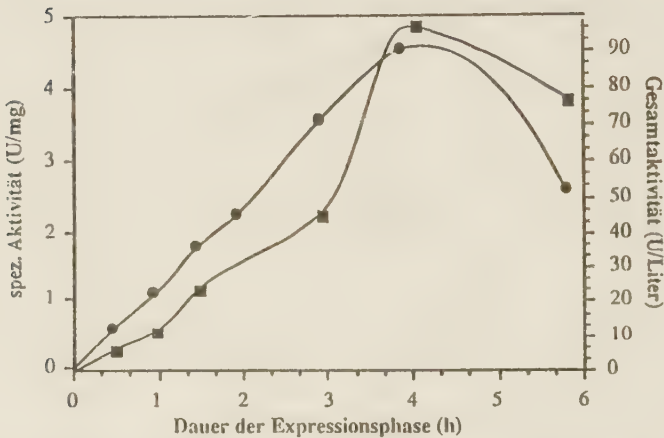


Abb. 19:

Abhängigkeit der Expression der *M. fervidus*-GAPDH in Klon EX-D6 von der Dauer der Expressionsphase.

Kreise: spezifische Aktivität; Vierecke: Gesamtkaktivität.

1.2.5 Präparation der M. fervidus-GAPDH aus E. coli

Entsprechend den oben beschriebenen Optimierungsversuchen wurde für die Präparation der M. fervidus-GAPDH aus dem Klon EX-D6 die Expression bei einer $OD_{578}=1,0$ mit 1 mM IPTG induziert. Die Zellernte erfolgte nach maximal 5 h. Eine typische GAPDH-Aufreinigung ist in Tab. 9 gegeben. Durchschnittlich wurde aus 5 g Zellen 1 mg GAPDH gewonnen. Die Ausbeute lag damit ca. vier mal höher als im homologen System (1 bis maximal 1,5 mg Enzym pro 20 g M. fervidus-Zellen; Fabry und Hensel, 1987). Von erheblichem Vorteil bei der Enzymreinigung der archaeobakteriellen GAPDH war die Hitzestabilität des Enzyms, wodurch bereits im ersten Reinigungsschritt eine mehr als sechsfache Anreicherung erzielt werden konnte. Außerdem ermöglichte die Hitzebehandlung eine problemlose Abtrennung der E. coli-GAPDH aus dem Proteinextrakt. Die nach der Affinitätschromatographie erforderlichen Chromatographieschritte waren mit keinen weiteren Enzymverlusten verbunden. Der Reinheitsgrad des nach der Affinitätschromatographie gewonnenen Produktes wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft (Abb. 20).

Tabelle 9

Reinigung der M. fervidus-GAPDH aus dem Expressionsklon EX-D6

	Rohextrakt*	nach Hitzefällung	nach Affinitätschromatographie
Proteingehalt	300 mg	46 mg	2 mg
Volumenaktivität	150 U	150 U	90 U
spezifische Aktivität	0,5 U/mg	3,26 U/mg	45,0 U/mg
Anreicherung	-	6,5 fach	90 fach
Ausbeute	100 %	100 %	60 %

* aus 10 g Naßzellen



Abb. 20:
 SDS-Polyacrylamid-Gel zur Veranschaulichung der Reinigungsschritte der durch *E. coli* exprimierten *M. fervidus*-GAPDH.
 Von links nach rechts: Rohextrakt, Überstand nach Hitzebehandlung, Überstand nach Affinitätschromatographie. Ganz rechts als Kontrolle die Original-*M. fervidus*-GAPDH.

1.2.6 Vergleich zwischen der *M. fervidus*-GAPDH aus *E. coli* und der GAPDH aus dem Original-Organismus

Um zu überprüfen, inwieweit das in *E. coli* exprimierte Enzym mit dem Originalenzym phänotypisch übereinstimmt, wurden beide GAPDHs hinsichtlich ihrer kinetischen Parameter (Tab. 10) und ihrer Thermostabilitätseigenschaften (Tab. 11) verglichen. Wie beide Tabellen zeigen,

sind die Proteine phänotypisch nicht unterscheidbar. Weiterhin wurde durch Ansequenzieren der ersten drei N-terminalen Aminosäuren der in *E. coli* exprimierten *M. fervidus*-GAPDH (F. Lottspeich, MPI für Biochemie, Martinsried) nachgewiesen, daß das Start-Methionin hier ebensowenig prozessiert wird wie in *M. fervidus* selbst. Das in *E. coli* exprimierte Enzym zeigte außerdem in der SDS-Gelelektrophorese das gleiche auffällige Retardationsverhalten wie das Originalenzym.

Somit sprechen alle Untersuchungen dafür, daß die beiden Enzyme strukturell und funktionell identische Eigenschaften besitzen.

Tabelle 10

Kinetische Parameter der *M. fervidus*-GAPDH aus *E. coli* EX-D6 und der *M. fervidus*-GAPDH aus dem Original-Organismus

Variables Substrat	K_m (mM)		v_{max} (U/mg Protein)	
	<i>E. coli</i> EX-D6	<i>M. fervidus</i>	<i>E. coli</i> EX-D6	<i>M. fervidus</i>
Arsenat	44	44	15	14
Phosphat	35	35	9	9
NAD^+	0,5	0,5	14	13,5
$NADP^+$	0,003	0,003	7,0	7,0

Die Konzentration der invariablen Substrate betrug: Arsenat: 150 mM
 3-PG : 2 mM
 NAD^+ : 2 mM

Die Test-Temperatur betrug 40 °C

Tabelle 11

Stabilisierender Einfluß verschiedener Salze auf die *M. fervidus*-GAPDH aus *E. coli* EX-D6 und auf die *M. fervidus*-GAPDH aus dem Original-Organismus

Zugesetztes Salz (jeweils 250 mM)	Restaktivität (%) *	
	GAPDH aus induzierten <i>E. coli</i> -Zellen	GAPDH aus <i>M. fervidus</i> -Zellen
Kaliumsalz des zyklischen 2,3-DPG	95	95
Kaliumphosphat	70	72
Natriumphosphat	58	60
Kaliumchlorid	5	5
Natriumchlorid	2	2

*gemessen nach 30 min Inkubation bei 90 °C

1.3 Gezielte Mutagenese am *gap*-Gen von *M. fervidus*

Mit der Anwendung der gezielten Mutagenese sollten die strukturellen Faktoren eingegrenzt werden, die den thermophilen Phänotyp der *M. fervidus*-GAPDH bestimmen. Dieser ist einmal durch seine im Vergleich zum mesophilen Enzym höhere Thermostabilität gekennzeichnet (J. Biro, Dissertation 1989). Ein deutlicher Unterschied zeigt sich aber auch bezüglich der Temperaturkompensation der Aktivität: Diese tritt beim thermophilen Enzym erst im oberen Temperaturbereich (ab 52 °C) auf (Fabry und Hensel, 1987), während sie bei der *M. bryantii*-GAPDH über den gesamten Meßbereich gefunden werden kann (J. Biro, Dissertation 1989).

Nachdem der Vergleich zwischen der M. fervidus-GAPDH und dem mesophilen Enzymhomologen aus M. bryantii die Aufmerksamkeit auf einige besonders typische Austausche gelenkt hatte (vgl. Tab. 8 und Punkt 1.1.5), war es naheliegend, den Einfluß einiger dieser Austausche auf Stabilität und Aktivität im M. fervidus-Enzym durch gezielte Mutagenese zu untersuchen. Die durchgeführten Mutationen an der thermophilen GAPDH orientierten sich dabei an der Situation im mesophilen Enzym. Sie betrafen die Positionen 96, 103, 279, 285 und 290 der M. fervidus-Sequenz (entspricht Pos. 98, 105, 282, 288 und 293 in Abb. 15), an denen sich die Strukturen beider thermophiler GAPDHs bei der Bevorzugung von sperrigeren Resten gegenüber kleinen Resten in den mesophilen Homologen konform verhielten. Mit den Mutanten G_{96A}, P_{279G} und N_{290G} wurde der beobachtete Glycin-Zugewinn und mit I_{103L} sowie I_{285L} der Effekt des Isoleucin-Leucin-Austausch auf den thermophilen Phänotyp überprüft. L_{268I} diente als Kontrollmutante.

1.3.1 Konstruktion geeigneter Plasmide

Bei der im folgenden beschriebenen Plasmidkonstruktion wurde versucht, ein Fragment in den Mutagenese-Vektor einzuführen, das möglichst auf den Bereich des gap-Gens beschränkt war. Dadurch sollte der Einzelstrangbereich in der Gapped Duplex auf ein Minimum reduziert werden. Außerdem erschien es für die Konzeption der Oligonukleotide und der erforderlichen Rekombinationsschritte vorteilhaft, alle DNS-Bereiche mit unbekannter Sequenz zu eliminieren. Die Plasmidkonstruktionen können anhand entsprechender Abbildungen mitverfolgt werden.

Zunächst wurde, wie bereits in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, aus dem Genbank-Plasmid p73A2 mit Hilfe von Bsm I ein gap-Gen-tragendes DNS-Fragment gewonnen, dem die Stromaufwärts-Sequenz der kodierenden Sequenz bereits vollständig fehlte. Dieses Fragment wurde nach Entfernung der überstehenden Einzelstrang-Enden in die Sma I-Stelle von pUC 18 ligiert. Dadurch entstand das 4001 bp große Plasmid pBgap (Abb. 21, oben und Mitte links; Anh. Abb. B), dessen Sequenz nun auch vollständig bekannt war.

Abb. 21:

Schematisches Fließdiagramm zur Konstruktion der Plasmide pBgap und pBTgap. Bei der Darstellung kurzer, aber für die Konstruktion wichtiger DNS-Abschnitte wurde auf eine proportionale Wiedergabe verzichtet.

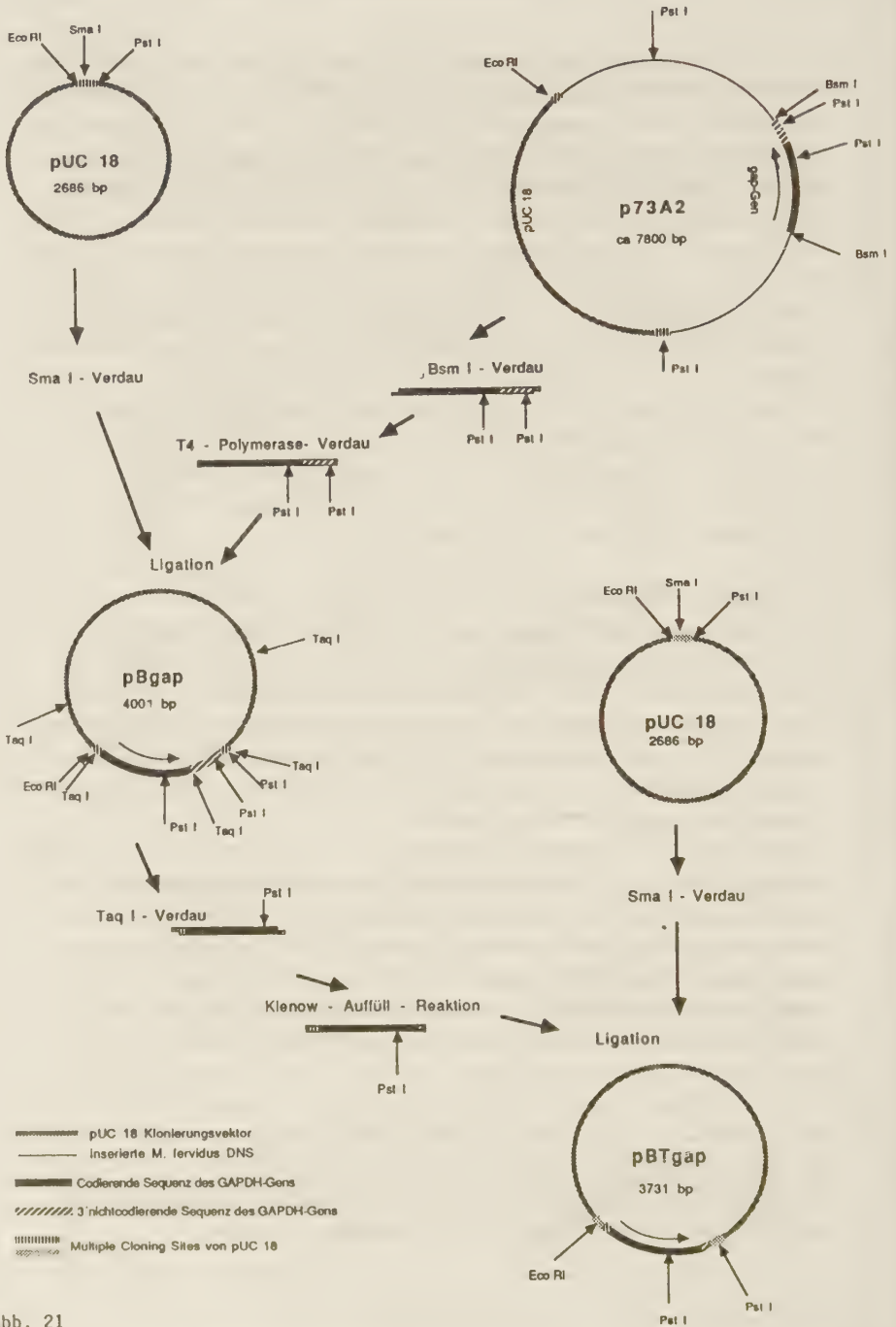


Abb. 21

Die dadurch mögliche Computeranalyse ergab günstige Positionen von Taq I-Schnittstellen, die eine weitere Stromabwärts-Verkürzung des Inserts auf 1031 bp erlaubten. Nach erneuter Ligation in Sma I-linearisierten pUC 18 ergab sich pBTgap (3731 bp; s. Abb. 21, Mitte und unten rechts; Anh. Abb. C). Die Tatsache, daß durch den zweiten Subklonierungsschritt ein Teil der MCS im Plasmid verdoppelt wurde, war dabei für die weiteren Klonierungsschritte unerheblich.

Nach Verdau von pBTgap mit Eco RI und Bam HI und gerichteter Ligation des gap-Gen tragenden Fragments in ebenso geschnittenen Vektor pMa ergab sich das Konstrukt pMAgap (4859 bp), in dessen Klonierungsstelle nur noch die kodierende Sequenz des gap-Gens, 20 bp des Stromabwärts-Bereichs und ein Ausschnitt aus zwei (sich z.T. wiederholenden) MCSs von pUC 18 vorlag. Das Insert war hierbei so orientiert, daß der Plus-Strang von pMAgap den kodierenden Strang des gap-Gens (Abb. 22; Anh. Abb. D) enthielt.

1.3.2 Durchführung der Mutationen

1.3.2.1 Verwendete Oligonukleotide

Vorgegeben durch die Orientierung des gap-Gens in pMAgap mußten die Mutagenese-Oligonukleotide entsprechend der antikodierenden Gensequenz synthetisiert werden. Die Positionen der verschiedenen Mutationen und die Hybridisierungsstellen der verwendeten Sequenzierprimer sind in Abb. 23 gezeigt.

Abb. 22:
Schematisches Fließdiagramm zur Konstruktion des Mutagenese-Plasmids pMAgap.
Bei der Darstellung kurzer, aber für die Konstruktion wichtiger DNS-Abschnitte wurde auf eine proportionale Wiedergabe verzichtet.

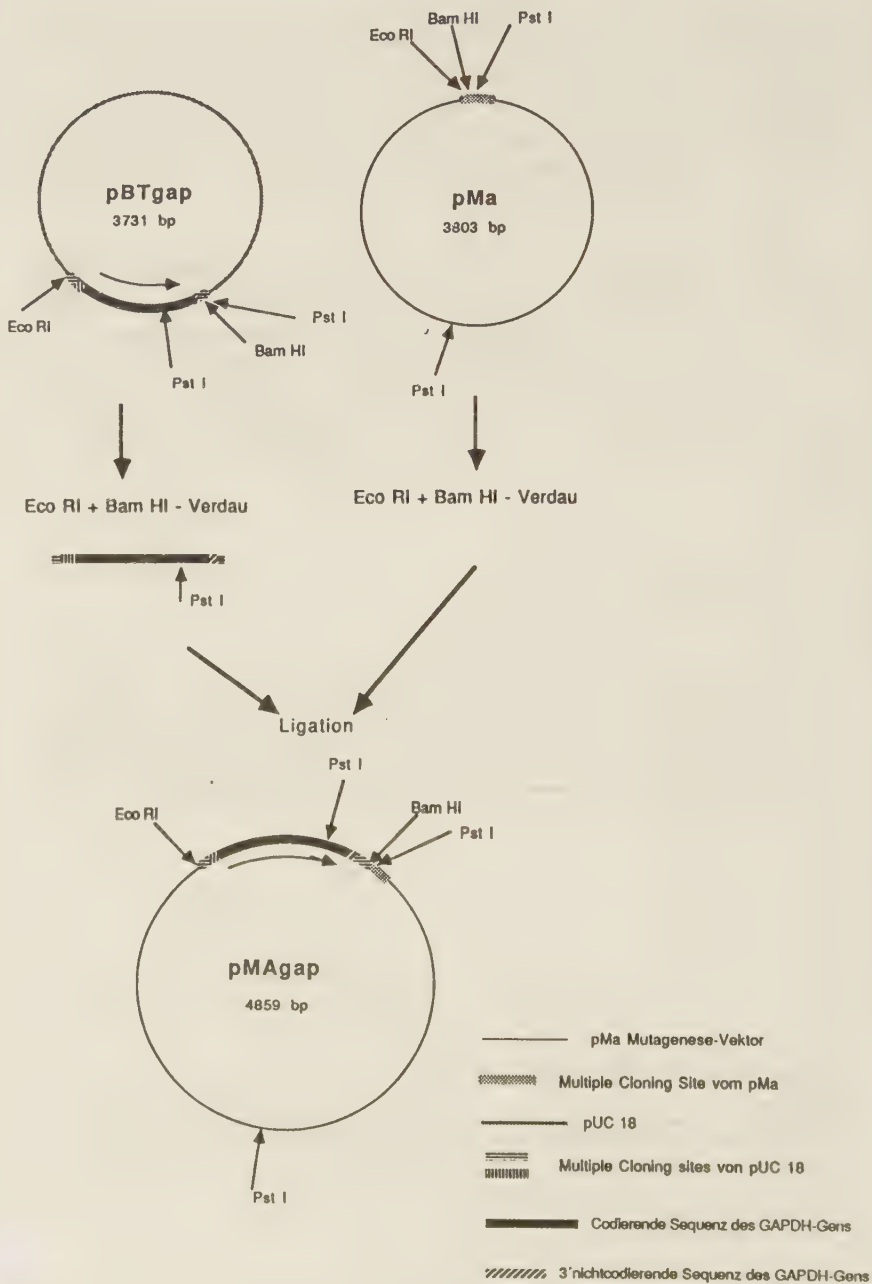


Abb. 22

Tabelle 12

Mutanten der *M. fervidus* - GAPDH und die eingesetzten Mutagenese-Oligonukleotide. Die zur Mutation führenden Basen sind eingrahmt.

Mutante	Mutagenese-Oligonukleotid	Sequenz des Mutagenese-Oligonukleotids
G _{96a}	Ol ₂₆ -ins ₂₈₈ GGA	5'CTTTATACATTCCTTTTAAATTTTG 3'
	Ol ₄₄ -ins ₂₈₈ GGA	5'GCTTTTATCCTTTTTCTTATACATTCCTTTTAAATTTTGGC 3'
I ₁₀₃ L	Ol ₁₇ -A ₃₀₇ T	5'GCTTTTAATCCTTTTTC 3'
L ₂₆₈ I	Ol ₁₉ -T ₈₀₂ A	5'GATCTACCTATTCCTTTG 3'
P ₂₇₉ G	Ol ₂₂ -CC _{835,836} GG	5'CTCCAAACCAATTTCAAATA 3'
	Ol ₄₁ -CC _{835,836} GG	5'CAGTTATTGATTCTCTCCAACACCAATTTCAAATAAA 3'
I ₂₈₅ L	Ol ₁₈ -A ₈₅₃ T	5'CGACAGTTATGATTCTC 3'
N ₂₉₀ G	Ol ₂₆ -AA _{868,869} GG	5'GTAATAAAATTCACCGTCTACGACAG 3'

Zur Erzeugung von fünf definierten Basenaustauschen und einer Baseninsertion wurden die in Tab. 12 aufgelisteten Oligonukleotide verwendet. Ihre Hybridisierungsposition in der Sequenz kann aus Tabelle 12 und Abb. 23 ermittelt werden.

Für zwei der Mutationen (G_{96a} und P₂₇₉G) wurden Oligonukleotide von mehr als 40 b Länge eingesetzt (Ol₄₁-CC_{835,836} GG; Ol₄₄-ins₂₈₈ GGA), nachdem die kürzeren Vorläufer (Ol₂₂ CC_{835,836} GG, Ol₂₆-ins₂₈₈ GGA) sich als nicht mutagen erwiesen hatten.

Zur Überprüfung der gesetzten Mutation sowie zur Sicherstellung, daß keine Fehler durch den in-vitro-Auffüll-Prozess der Polymerasereaktion entstanden waren, wurde das gesamte gap-Gen mit fünf internen Primern (Pr1, Pr2a, Pr3, Pr4, Pr5) sequenziert. Bei der Konstruktion dieser Primer wurde darauf geachtet, daß ihre Zielsequenzen im gap-Gen einen Abstand von jeweils ca. 200 bp hatten und daß eine möglichst hohe Hybridisierungsspezifität erwartet werden konnte. Bei der Mutante P₂₇₉G ergab sich wegen der Überlappung von Mutationsort und Primerbindungsstelle von Pr2a die Notwendigkeit, zur Sequenzierung des entsprechenden DNS-Abschnittes einen alternativen Primer (Pr2b) zu verwenden.

1.3.2.2 Erzielte Mutanten

Da aus methodischen Gründen Wert darauf gelegt wurde, den Aminosäureaustausch mit einer möglichst geringen Zahl von Basenaustauschen zu erzielen, gab sich keine der Mutationen durch Bildung oder Zerstörung einer leicht detektierbaren Restriktionsstelle zu erkennen. Deshalb konnten die mutierten gap-Gene von den unmutierten nur durch Sequenzierung unterschieden werden. Die Anzahl der analysierten Klone und die Ausbeute an Mutanten zeigt Tab. 13.

Die Gesamtheit der pMc-Derivate mit den veränderten gap-Genen wird im folgenden unter dem Sammelbegriff pMCgap^{mut} subsummiert.

Tabelle 13

Eingesetzte GAPDH-Mutagenese-Oligonukleotide und die erzielte Mutanten-Ausbeute

Mutante	Verwendetes Mutagenese-Oligo	Gesamtzahl geprüfter Klone	Klone mit Mutation	Ausbeute
G _{96a}	Ol ₂₆ -ins ₂₈₈ GGA	15	0	0%
	Ol ₄₄ -ins ₂₈₈ GGA	7	7	100%
I ₁₀₃ L	Ol ₁₇ -A ₃₀₇ T	8	1	12,5%
L ₂₆₈ I	Ol ₁₉ -T ₈₀₂ A	9	3	33,3%
P ₂₇₉ G	Ol ₂₂ -CC _{835,836} GG	32	0	0%
	Ol ₄₁ -CC _{835,836} GG	9	3	33,3%
I ₂₈₅ L	Ol ₁₈ -A ₈₅₃ T	3	1	33,3%
N ₂₉₀ G	Ol ₂₆ -AA _{868,869} GG	9	3	33,3%

1.3.3 Expression der mutierten gap-Gene in E. coli

1.3.3.1 Konstruktion der Expressionsplasmide

Der Aufbau der Expressionsplasmide für die mutierten gap-Gene wurde analog zu pJFgap-1 durchgeführt. Die bei der Konstruktion von pMAGap entstandene Kpn I-Schnittstelle 2 bp vor dem Startcodon des Gens bedingte dabei - im Vergleich zu pJFgap-1 - eine Verlängerung des Abstandes zwischen der Vektor-RBS und dem ATG um 2 bp auf insgesamt 10 bp.

Der Plasmidaufbau wurde zunächst am unmutierten System (pMAGap) erprobt und ist im Detail (Anh. Abb. E) auch nur hierfür gezeigt. Er verlief aber für die pMCgap^{mut}-Plasmide entsprechend (vgl. Übersicht in Abb. 24).

Plasmid pMAGap (bzw. pMCgap^{mut}) wurde stromaufwärts vom gap-Gen mit Kpn I geschnitten. Nach Entfernung der überstehenden Einzelstrang-Enden mit T4-Polymerase wurde das gap-Gen durch Bam HI vom Vektor getrennt. Der Expressionsvektor pJF118EH wurde mit Eco RI linearisiert, mit Klenow-Polymerase an den Enden aufgefüllt und mit Bam HI nachgeschnitten. Diese Vorbereitungen erlaubten eine gezielte Ligation von Vektor und Fragment, die eine 50%-ige Ausbeute an exprimierenden Klonen erbrachte. Die rekombinierten Plasmide mit dem Wildtyp-Gen wurden mit pJFgap-2 bezeichnet, die Plasmide mit den mutierten gap-Genen unter dem Sammelbegriff pJFgap^{mut} zusammengefaßt.

Die Plasmide hatten eine Länge von 6301 bp (bzw. 6304 bp bei EXG_{96a}, bedingt durch die bei der Mutation hier zusätzlich inserierten 3 bp).

Bei allen pJFgap^{mut}-Plasmiden wurde die korrekte Rekombination vor den gap-Genen und der Mutationsbereich durch Sequenzierung überprüft.

Abb. 24:

Schematisches Fließdiagramm zur Konstruktion des Expressionsplasmids pJFgap-2 bzw. von pJFgap^{mut}-Derivaten. Bei der Darstellung kurzer, aber für die Konstruktion wichtiger DNS-Abschnitte wurde auf eine proportionale Wiedergabe verzichtet.

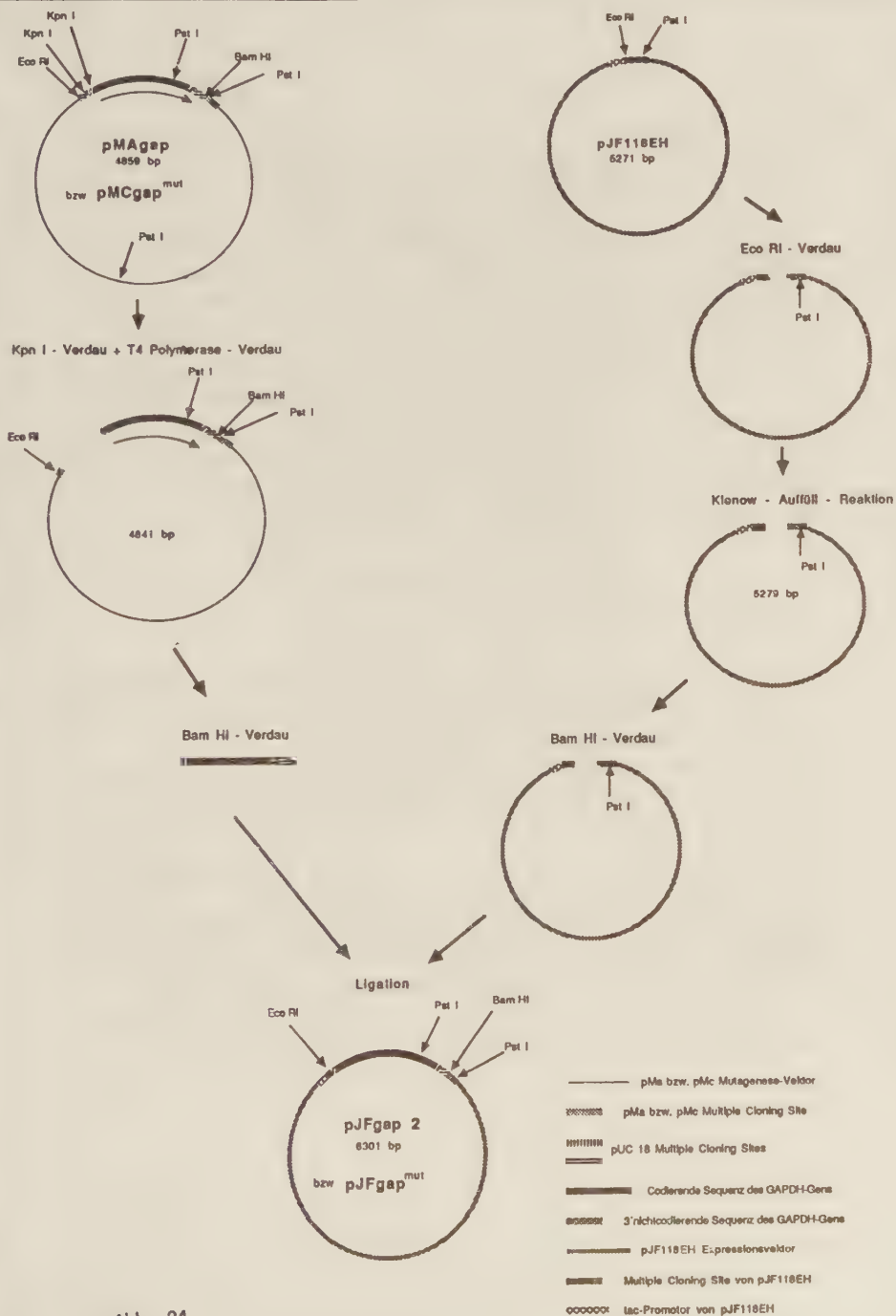


Abb. 24

1.3.3.2 Expression mit pJFgap-2

Die Expression mit der neuen Plasmidkonstruktion wurde zunächst mit dem unmutierten Gen aus Plasmid pJFgap-2 erprobt. Dabei zeigte sich, daß pJFgap-2 dem früher konstruierten Plasmid pJFgap-1 in der Expressionsleistung deutlich überlegen war: pJFgap-2 erlaubte eine Verdoppelung der Enzymproduktion im Vergleich zu pJFgap-1. Da sich pJFgap-2 und pJFgap-1 nur im Abstand zwischen ATG und RBS unterscheiden, muß die erhöhte Effizienz von pJFgap-2 wohl auf die hier größere Distanz (10 bp) zurückgeführt werden. Diese Erklärung wird durch neuere Untersuchungen von Dalbøge et al. (1988) gestützt, nach denen der für heterologe Genexpression optimale Abstand zwischen RBS und ATG um 11 bp liegen soll.

1.3.3.3 Isolierung mutierter Enzyme

Die nach gezielter Mutagenese und entsprechender Umklonierung vorliegenden pJFgap^{mut}-Plasmide wurden nach dem Standard-Verfahren (1.2.5) in E. coli zur Expression gebracht.

Die Präparation der mutierten Genprodukte erfolgte generell nach dem für die Wildtyp-GAPDH ausgearbeiteten Reinigungsschema. Die Temperatur der Hitzefällung wurde allerdings in den meisten Fällen auf 75 °C erniedrigt. Außerdem fand zwischen Hitzefällung und Affinitätschromatographie noch eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung statt.

Je nach Thermolabilität des Muteins war der Aktivitätsverlust durch die Hitzeinkubation z.T. ganz erheblich, konnte jedoch im Interesse einer vollständigen Abtrennung der E. coli-GAPDH nicht vermieden werden.

Die Reinheit der Muteine wurde durch SDS-Gelelektrophorese überprüft (Abb. 25); eine Übersicht über den Reinigungsverlauf bietet Tab. 14.

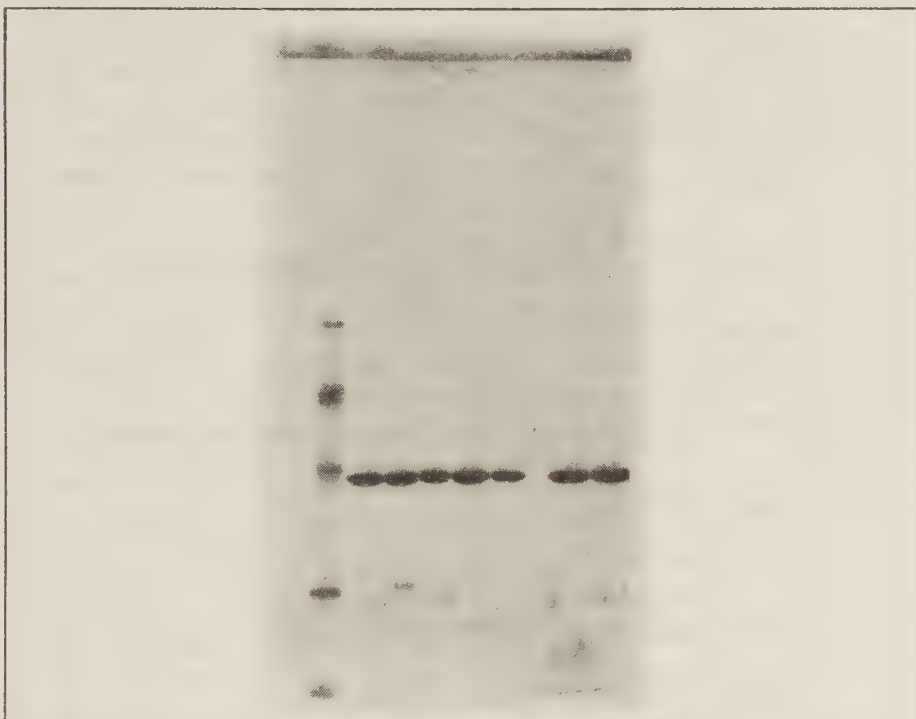


Abb. 25:

SDS-Polyacrylamid-Gel zur Dokumentation der Reinheit der GAPDH-Mutante.

Von links nach rechts: Längenstandard, P₂₇₉G, N₂₉₀G, Wildtyp-M. fervidus-GAPDH, I₂₈₅L, L₂₆₈I, G₉₆A, I₁₀₃L.

Die Proteine des Längenstandards sind (von oben nach unten): Phosphorylase b aus Rattenmuskel (MG = 97400), Rinder-Serumalbumin (MG = 66200), Ovalbumin (MG = 42700), Rinder-Carboanhydrase (MG = 31000) und Trypsin-Inhibitor aus Soja (MG = 21500).

Tabelle 14

Reinigungstabelle für die GAPDH-Mutene

Mutante		Rohextrakt *	Hitze- fällung	Ammonium- sulfatfällung	Affinitätschro- matographie	Endrei- nigung **
G _{96a}	Ausbeute	100%	5% ***	4%	1,6%	1,5%
	Gesamtak- tivität (U)	122,0	6,1	1,8	0,8	0,7
	spezifische Ak- tivität (U/mg)	-	-	-	-	65,9
	Gesamtprotein (mg)	-	-	-	-	0,019
I _{103L}	Ausbeute	100%	33% ***	28%	21%	20%
	Gesamtak- tivität (U)	490,0	161,8	137,0	103,2	95,7
	spezifische Ak- tivität (U/mg)	-	-	-	-	66,15
	Gesamtprotein (mg)	-	-	-	-	2,21
L _{268I}	Ausbeute	100%	70%	48%	21%	21%
	Gesamtak- tivität (U)	44,9	31,4	24,6	10,9	10,9
	spezifische Ak- tivität (U/mg)	-	-	-	-	62,1
	Gesamtprotein (mg)	-	-	-	-	0,31
P _{279G}	Ausbeute	100%	90%	65%	26%	26%
	Gesamtak- tivität (U)	55,5	50,0	36,1	14,2	14,2
	spezifische Ak- tivität (U/mg)	-	-	-	-	52,4
	Gesamtprotein (mg)	-	-	-	-	0,30
I _{285L}	Ausbeute	100%	80%	58%	29%	29%
	Gesamtak- tivität (U)	73,5	58,8	29,8	15,0	15,0
	spezifische Ak- tivität (U/mg)	-	-	-	-	66,4
	Gesamtprotein (mg)	-	-	-	-	0,29
N _{290G}	Ausbeute	100%	94%	56%	22%	20%
	Gesamtak- tivität (U)	138,3	130,0	77,8	30,4	28,0
	spezifische Ak- tivität (U/mg)	-	-	-	-	81,0
	Gesamtprotein (mg)	-	-	-	-	0,52

* aus 10 g Naßzellen

** nach Aminohexylsepharose-Hydroxylapatit-Chromatographie

*** wegen Schwierigkeiten bei der Weiterreinigung bei 80 °C gefällt

1.4 Phänotypische Beschreibung der GAPDH-Muteine

Zur Charakterisierung der Mutein-Phänotypen wurde sowohl die Thermostabilität der Enzyme als auch die Temperaturabhängigkeit ihrer Aktivität gemessen. Zum Vergleich wurde das thermophile Wildtyp-Enzym (*M. fervidus*-GAPDH) aus *E. coli* sowie die mesophile Wildtyp-GAPDH von *M. bryantii* (Daten von J. Biro, Dissertation 1989) mit in die Untersuchungen einbezogen.

1.4.1 Thermostabilität

Als Maß für die Thermostabilitäten wurde die Geschwindigkeit der irreversiblen Hitze-Inaktivierung der Proteine herangezogen. Im allgemeinen zeigten die Enzyme komplexe Inaktivierungskinetiken, die für mindestens zwei, möglicherweise aber noch mehr verschiedene Denaturierungsreaktionen sprechen (s. Abb. 26).

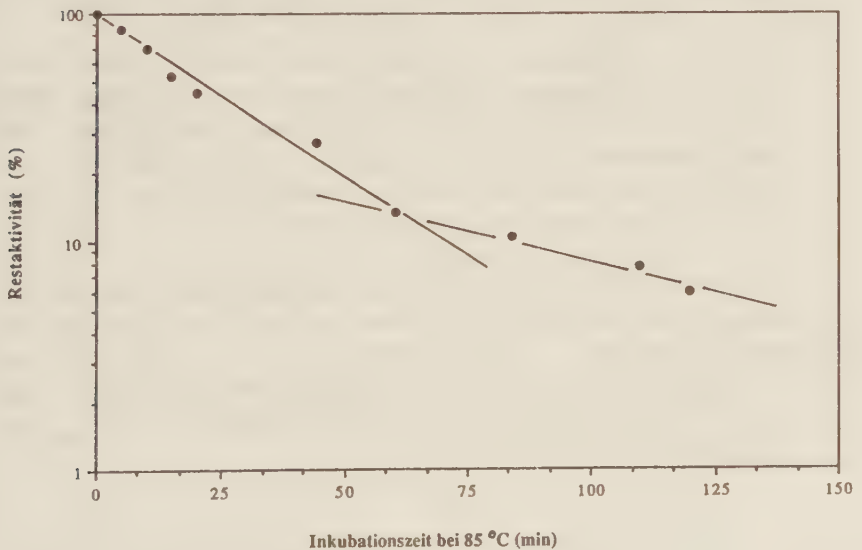


Abb. 26:
Zeitabhängige Hitze-Inaktivierung des GAPDH-Muteins P279G bei 85 °C.

Da im beobachteten Konzentrationsbereich (30-90 µg Protein/ml; geprüft im Fall der Wildtyp-M. fervidus-GAPDH und des Muteins P₂₇₉G) keine Abhängigkeit der Inaktivierungsgeschwindigkeit von der Proteinkonzentration festgestellt werden konnte, handelt es sich offensichtlich bei diesen Denaturierungsprozessen um Reaktionen erster Ordnung. Die angegebenen Halbwertszeiten beziehen sich jeweils auf die erste, schnelle Inaktivierungsphase.

Die Thermostabilität der GAPDH-Muteine wurde zunächst bei niedriger Ionenstärke (10 mM K-Phosphat) geprüft. Die Meßergebnisse sind in Abb. 27 wiedergegeben. Aus dieser Darstellung, die die Temperaturabhängigkeit der Inaktivierungsgeschwindigkeit zeigt, ergibt sich für die Thermostabilität der untersuchten Proteine folgende Reihe:

$I_{103}^L > \text{M. fervidus-GAPDH} = I_{285}^L > N_{290}G > P_{279}G > L_{268}I >> G_{96a} >> \text{M. bryantii-GAPDH}.$

Der fast parallele Verlauf der Stabilitätskennlinien aller getesteten Enzyme deutet auf sehr ähnliche Denaturierungsprozesse hin, die für die Inaktivierung der verschiedenen GAPDH-Proteine verantwortlich sind.

Zur Differenzierung des Stabilitätseinflusses der verschiedenen Mutationen wurde die Thermostabilität einiger Enzyme auch in Gegenwart hoher Ionenstärken geprüft. Wie bereits gezeigt werden konnte (Fabry und Hensel, 1987; Hensel und König, 1988), läßt sich die Wildtyp-GAPDH von M. fervidus in vitro durch hohe Ionenstärken stabilisieren, wobei K-Phosphat - als Ersatz des in vivo vorliegenden K₃c₂,3-DPG - am effektivsten ist.

Das Ergebnis einer entsprechenden Untersuchung an vier GAPDH-Muteinen sowie der thermophilen und mesophilen Wildtyp-GAPDH zeigt Abb. 28. Im Vergleich mit Abb. 27 wird ersichtlich, daß in allen Fällen ein stabilisierender Effekt durch das erhöhte Ionenmilieu beobachtet werden kann. Allerdings ist der Stabilisierungseffekt im Falle von G_{96a} und I₁₀₃^L überdurchschnittlich hoch.

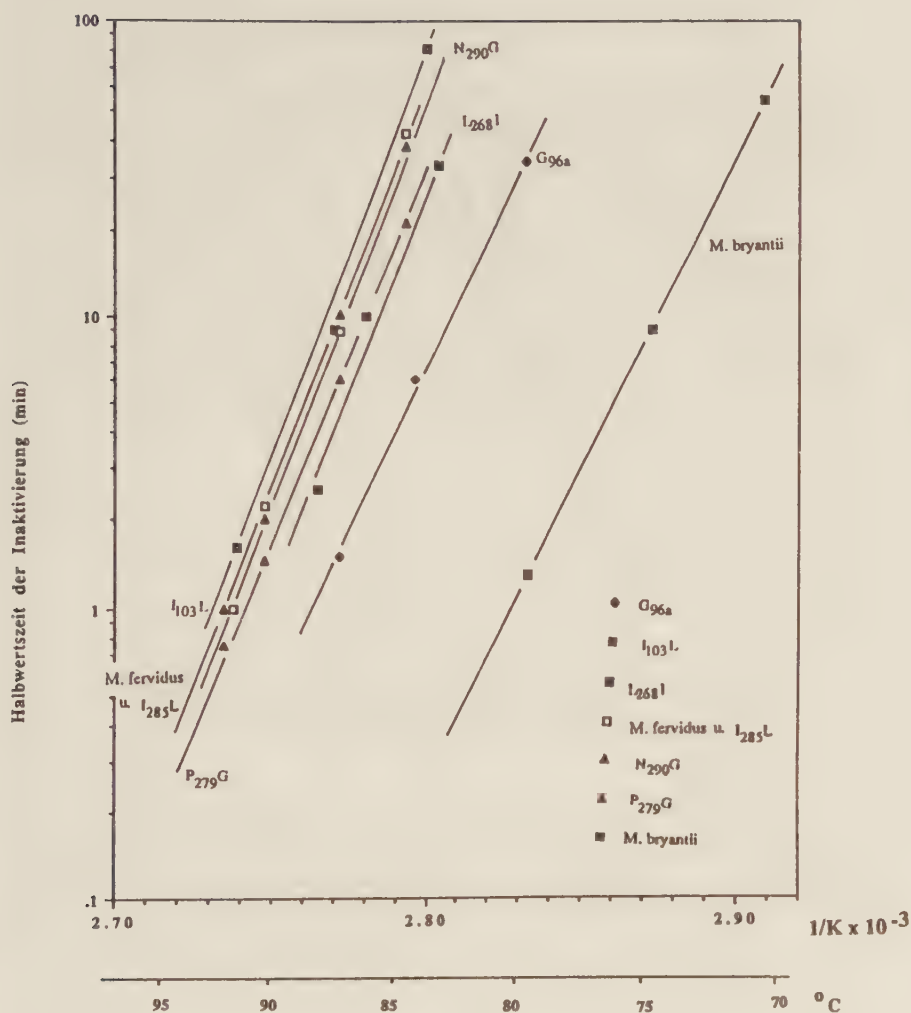


Abb. 27:
Intrinsische Stabilität der GAPDH-Mutene im Vergleich zur *M. fervidus*-GAPDH und der *M. bryantii*-GAPDH.
Aufgetragen wurden die Halbwertszeiten der irreversiblen Denaturierung gegen den Kehrwert der absoluten Temperatur.

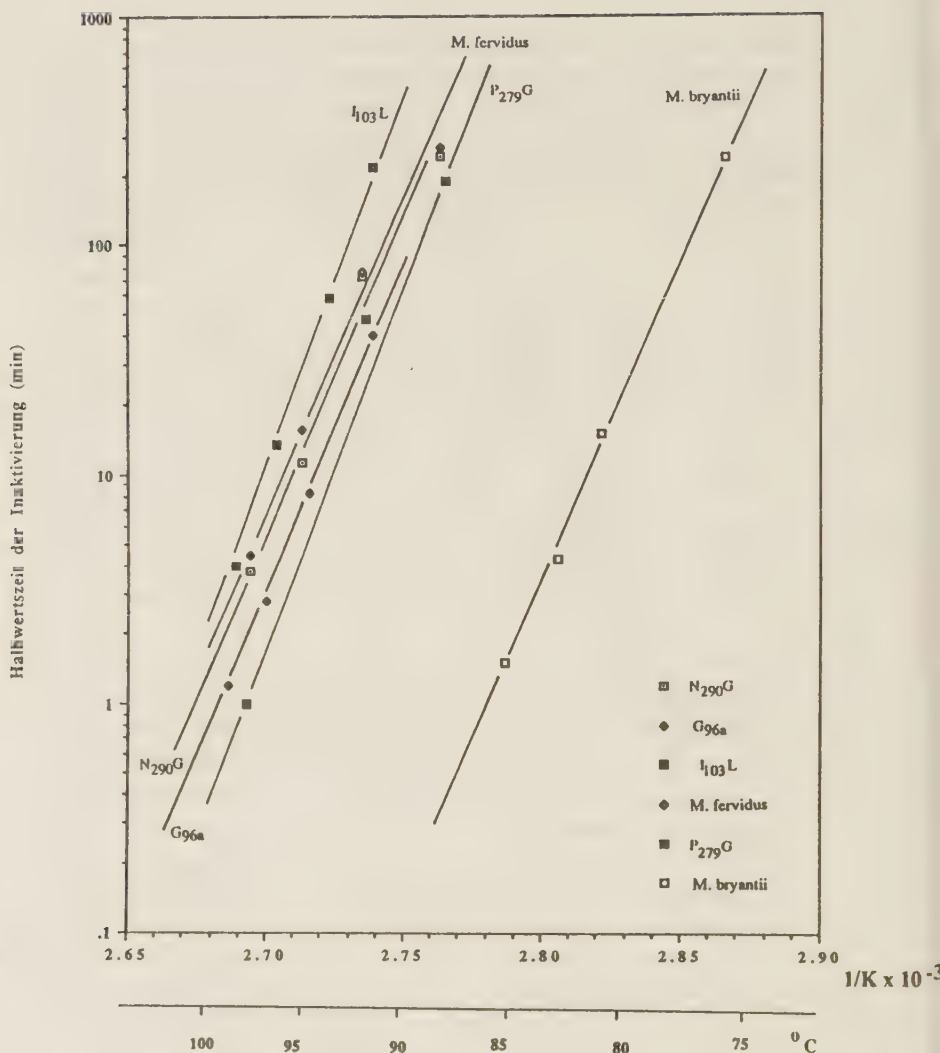


Abb. 28:

Stabilität der GAPDH-Mutante in Gegenwart von 0,5 M K-Phosphat im Vergleich zur GAPDH von *M. fervidus* und *M. bryantii*.

Aufgetragen wurden die Halbwertszeiten der irreversiblen Denaturierung gegen den Kehrwert der absoluten Temperatur.

1.4.2 Temperaturabhängigkeit der Aktivität

Zur Charakterisierung der durch die Mutationen veränderten enzymatischen Eigenschaften wurde die Temperaturabhängigkeit von K_m und v_{max} der GAPDH-Muteine bestimmt. Allerdings mußte aus Materialgründen auf entsprechende Untersuchungen an G_{96a} und I₂₈₅L verzichtet werden. Die Untersuchungen wurden auf Sättigungskinetiken mit NAD⁺ beschränkt, da entsprechende Messungen mit den Substraten GAP und 1,3-DPG aufgrund der Thermolabilität dieser Substanzen für uns nicht durchführbar waren, Phosphat bei höheren Temperaturen störende Farbreaktionen im Testansatz zeigte und Sättigungskinetiken mit dem artefiziellen Substrat Arsenat wohl keine physiologisch relevanten Rückschlüsse zulassen.

Tabelle 15

Temperaturabhängigkeit der kinetischen Parameter $K_m(\text{NAD}^+)$ und v_{max} der M. fervidus-GAPDH sowie von vier Muteinen

T (°C)	M. fervidus- GAPDH		N ₂₉₀ G		T (°C)	P ₂₇₉ G		I ₁₀₃ L		T (°C)	L ₂₆₈ I	
	v_{max} (U/mg)	K_m (mM)	v_{max} (U/mg)	K_m (mM)		v_{max} (U/mg)	K_m (mM)	v_{max} (U/mg)	K_m (mM)		v_{max} (U/mg)	K_m (mM)
---					36,1	5,4	0,79	7,3	0,90	34,6	4,7	0,70
41,3	7,5	0,75	14,8	0,85	39,5	8,6	0,86	11,0	1,00	41,3	9,7	0,80
46,0	12,9	0,85	25,8	0,98	46,0	14,5	1,05	20,0	1,18	45,9	12,5	0,86
51,0	20,1	0,95	35,6	1,12	50,1	21,7	1,22	27,6	1,35	50,8	21,5	0,92
56,0	28,1	1,20	51,3	1,33	55,8	37,2	1,55	41,0	1,44	55,0	30,2	1,08
61,2	39,0	1,38	68,7	1,54	61,1	51,1	1,75	60,5	1,78	60,2	43,3	1,20
65,0	48,2	1,85	80,5	1,62	65,3	58,0	1,80	69,0	1,70	65,2	59,0	1,56
71,0	60,0	2,05	109,0	1,94	69,5	70,2	2,23	90,8	2,11	70,1	85,2	2,02
75,3	81,9	2,60	136,2	2,20	75,0	91,3	2,45	115,6	2,49	---		

Die Ergebnisse sind in Tab. 15 und 16 sowie Abb. 29 und 30 gezeigt.

Bezüglich der Temperaturabhängigkeit von $v_{\max}$ verhalten sich alle untersuchten Muteine sehr ähnlich wie der Wildtyp. So ist den Mutanten der für den Wildtyp charakteristische Kurvenverlauf im Arrhenius-Plot gemeinsam, der im höheren Temperaturbereich (ab 52 °C) eine geringere Temperaturabhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit erkennen läßt als im tieferen (Abb. 29). Allerdings weisen die Muteine über den gesamten Temperaturbereich ein prinzipiell höheres $v_{\max}$ auf als die M. fervidus-GAPDH (vgl. dazu auch Tab. 16).

Tabelle 16

Spezifische Aktivitäten von den GAPDH-Muteinen im Vergleich zum Wildtyp

Enzym	spezifische Aktivität *
Wildtyp	100%
G _{96a}	146%
I _{103L}	147%
L _{268I}	138%
P _{279G}	116%
I _{285L}	148%
N _{290G}	180%

* bestimmt bei einer Test-Temperatur von 70 °C

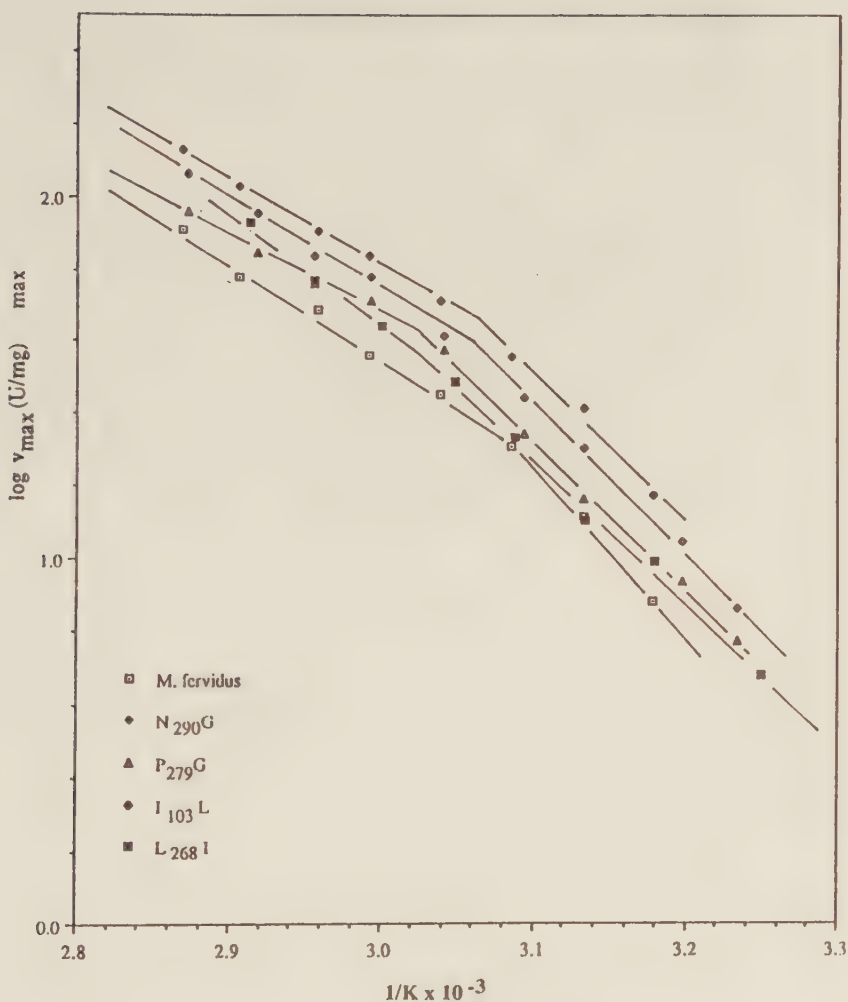


Abb. 29:

Arrhenius-Plot zur Veranschaulichung der Temperaturabhängigkeit von $v_{\max}$ für NAD⁺ bei der *M. fervidus*-GAPDH sowie vier GAPDH-Mutantein. Aufgetragen wurde der dekadische Logarithmus von $v_{\max}$ gegen den Kehrwert der absoluten Temperatur.

Demgegenüber ergibt die Temperaturabhängigkeit von K_m ein differenzierteres Bild (Abb. 30). Nur die Kontroll-Mutante $L_{268}I$ zeigt den für die M. fervidus-GAPDH typischen diskontinuierlichen Kurvenverlauf; die drei anderen Muteine weisen hingegen über den gesamten Temperaturbereich eine einheitliche Temperaturabhängigkeit ihres K_m auf.

Da zur Beurteilung der Umsatzeffizienz eines Enzyms *in vivo*, d.h. unter substratlimitierten Bedingungen, der Quotient k_{cat}/K_m als relevante Meßgröße herangezogen werden muß, wurde auch dieser Effizienz-Koeffizient für die verschiedenen Meßtemperaturen berechnet (s. Legende zu Abb. 31). Die Temperaturabhängigkeit von k_{cat}/K_m ist für die M. fervidus-GAPDH und die untersuchten Muteine in Abb. 31 dargestellt.

Wie zu ersehen, liegt beim Wildtyp-Enzym eine deutliche Temperaturkompensation oberhalb von 52-54 °C vor, die bei den Muteinen $N_{279}G$, $P_{290}G$ und $I_{103}L$ nicht zu erkennen ist. Bei der Kontrolle ($L_{268}I$) bleibt hingegen eine gewisse Temperaturkompensation erhalten.

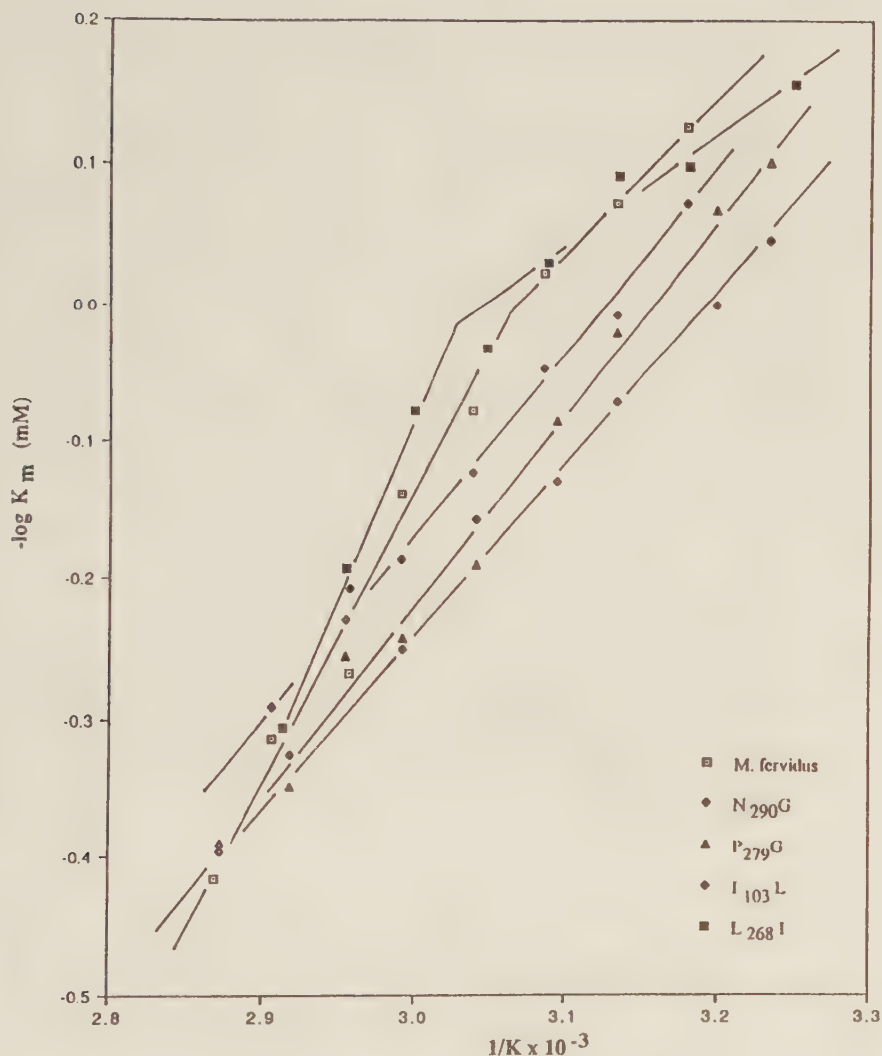


Abb. 30:
Van't-Hoff-Plot zur Veranschaulichung der Temperaturabhängigkeit von K_m für NAD⁺ bei der *M. fervidus*-GAPDH sowie vier GAPDH-Mutanten. Aufgetragen wurde der negative dekadische Logarithmus von K_m gegen den Kehrwert der absoluten Temperatur.

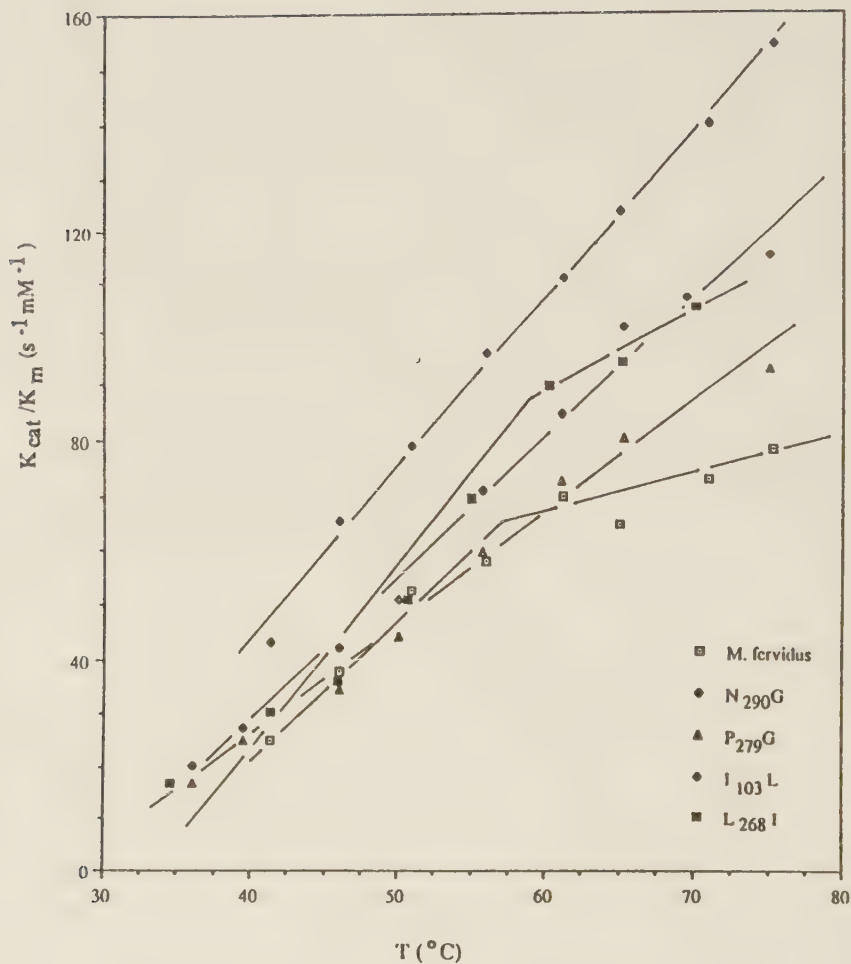


Abb. 31: Temperaturabhängigkeit des Quotienten aus k_{cat} und K_m für die *M. fervidus*-GAPDH sowie vier GAPDH-Mutante. k_{cat} wurde aus v_{max} nach der Beziehung $k_{cat} = v_{max}/\text{Enzymkonzentration}$ berechnet.

2. Expression des mdh-Gens von M. fervidus in E. coli

Die im Falle der GAPDH-Expression in E. coli gewonnenen Erfahrungen wurden genutzt, um auch das von E. Honka isolierte und sequenzierte mdh-Gen von M. fervidus (Diplomarbeit 1989; Honka et al., zur Publikation eingereicht) in einem heterologen System zur Expression zu bringen. Dadurch sollten die Voraussetzungen zu Mutageneseexperimenten an der MDH geschaffen werden, um den Gültigkeitsbereich der Aussagen über Thermophilie-spezifische Strukturmerkmale, die aus dem GAPDH-System abgeleitet wurden, zu erweitern. Zudem sollte gezeigt werden, daß die Expression funktioneller thermophiler M. fervidus-Enzyme in einem mesophilen Wirt kein auf die GAPDH beschränkter Sonderfall ist.

2.1 Gezielte Mutagenese am mdh-Gen

Im Fall des mdh-Gens war weder eine geeignete Restriktionsschnittstelle zur gezielten Positionierung des Gens hinter die Vektor-RBS von pJF118, noch ein Startcodon vorhanden, von dem eine optimale Translation im heterologen System hätte erwartet werden können (die Translation wird beim M. fervidus-mdh-Gen mit TTG eingeleitet). Deshalb mußten hier erst günstigere physikalische Voraussetzungen geschaffen werden. Dazu wurde wiederum eine gezielte Mutagenese mit der Gapped Duplex-Methode durchgeführt.

Abb. 32:

Schematisches Fließdiagramm zur Konstruktion des Plasmids pMP 1800. Bei der Darstellung kurzer, aber für die Konstruktion wichtiger DNS-Ab-schnitte wurde auf eine proportionale Wiedergabe verzichtet.

Abb. 33: Schematisches Fließdiagramm zur Konstruktion des mdh-Gen-tragenden Mutagenese-Plasmids pMDH.

Bei der Darstellung kurzer, aber für die Konstruktion wichtiger DNS-Ab-schnitte wurde auf eine proportionale Wiedergabe verzichtet.

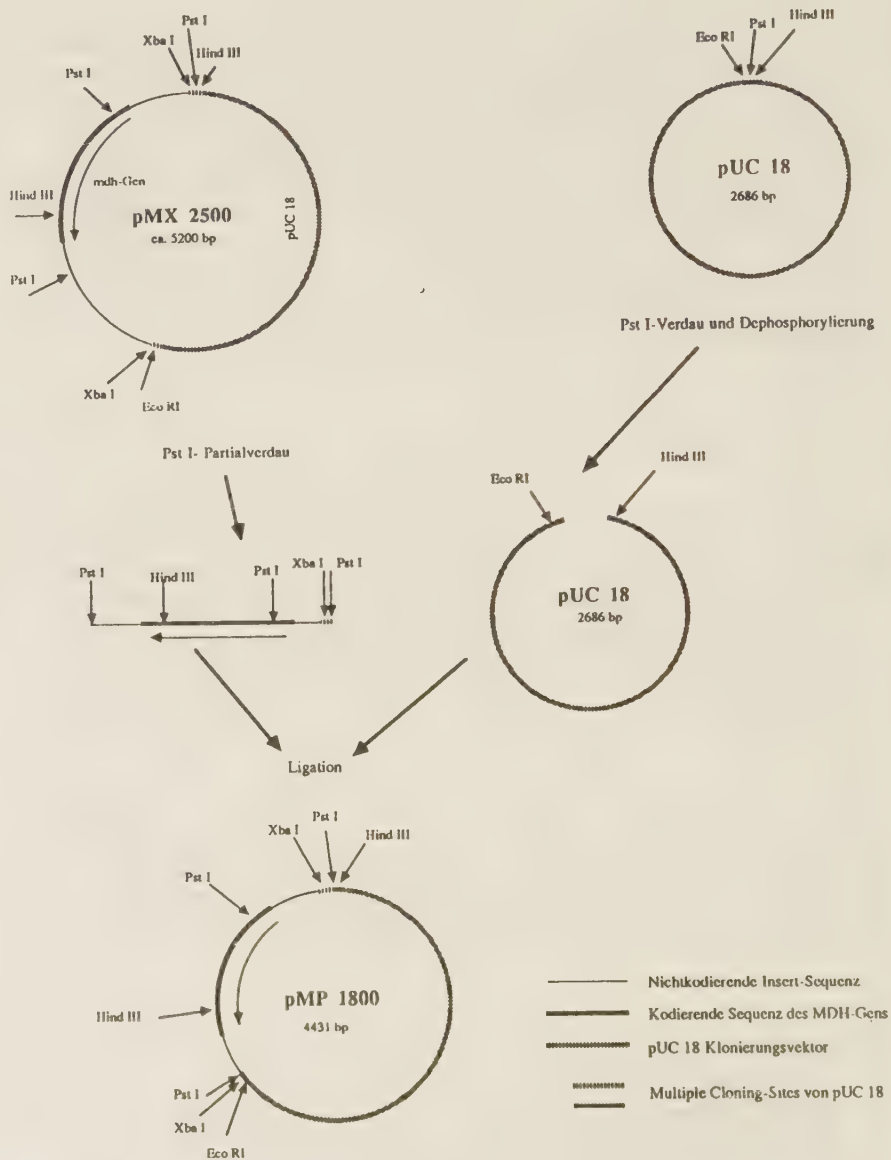


Abb. 32

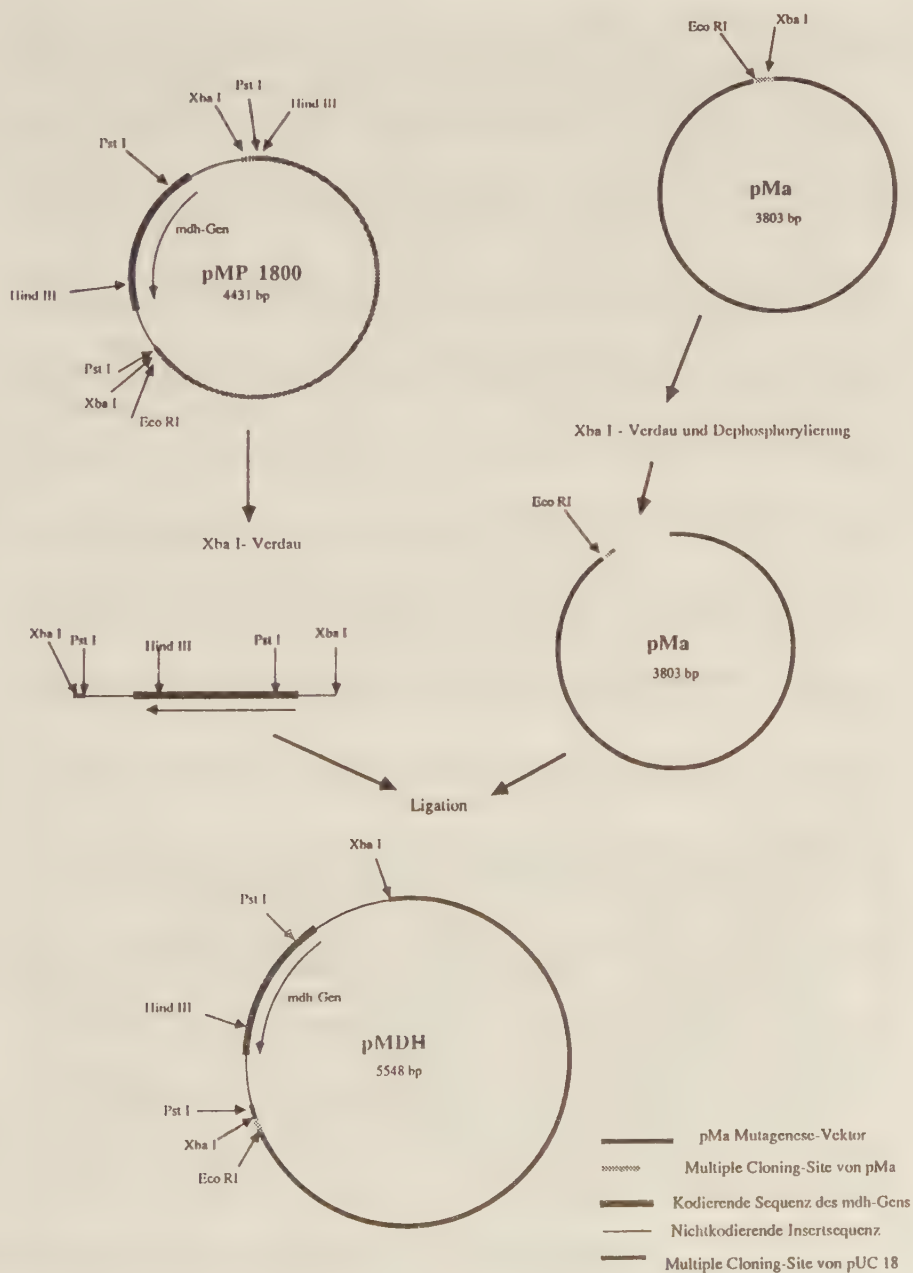


Abb. 33

2.1.1 Plasmidkonstruktion

Um die flankierenden DNS-Bereiche des *mdh*-Gens zu verkürzen, wurde zunächst das *mdh*-Gen-tragende DNS-Fragment aus dem rekombinierten pUC-Plasmid pMX 2500 (Abb. 32; E. Honka, nicht publiziert) durch Pst I-Partialverdau herausgeschnitten. Da die Mutagenesevektoren pMa/c durch Pst I zweimal geschnitten werden (vgl. Abb. 3) konnte das *mdh*-Gen tragende Pst I-Fragment erst auf dem Umweg über Ligation in pUC 18 (Plasmid pMP1800, 4431 bp; Abb. 32; Anh. Abb. F) und anschließende Exzision mit Xba I in pMa eingeführt werden. In dem gewonnenen Plasmid (pMDH; 5548 bp; Abb. 33; Anh. Abb. G) enthielt der Plus-Strang die antikodierende Sequenz des *mdh*-Gens. Für Mutagenese bzw. Sequenzierung mußten deshalb Oligonukleotide konzipiert werden, die in ihrer Orientierung dem kodierenden Strang entsprachen.

2.1.2 Durchführung der Mutagenese

Sowohl die Einführung einer geeigneten Schnittstelle für die Rekombination des *mdh*-Gens hinter die RBS des Expressionsvektors pJF118EH, als auch die Veränderung des Start-Codons konnte durch einen einzigen Mutagenese-Schritt erreicht werden (s. Abb. 34).

Abb. 34:

DNS-Sequenz (beide komplementären Stränge sind gezeigt) sowie die abgeleitete MDH-Aminosäuresequenz des Inserts von Mutageneseplasmid pMDH. Die kodierende Nukleotidfolge für die *M. fervidus*-MDH befindet sich im Minus-Strang des Plasmids (obere Sequenz). Bei der Numerierung erhielt die erste Base des Startcodons vom *mdh*-Gen die Nummer 1, die unmittelbar links benachbarte Base die Nummer -1. Einfach überstrichene Bereiche der Nukleotidfolge bezeichnen die Erkennungsregionen einiger charakteristischer Restriktionsenzyme; der doppelt überstrichene Bereich kennzeichnet die durch die Mutagenese neu geschaffene Hpa I-Erkennungsstelle. Die Position und Basenzusammensetzung des Mutagenese-Oligonukleotids ergibt sich aus der eingerahmten Nukleotidsequenz. Unterstrichene Basen-Bereiche zeigen die Sequenzen der zum Plus-Strang komplementären Sequenzierprimer. Die Namen der Primer sind oberhalb der unterstrichenen Abschnitte angegeben.

Xba I

-311 TCTAGCAGGCTTAATGAAGATATTGGATATTATTTAGACAACCTACCAGAACCAACCAATTTTAAATCTATTATAAATAGGAGTACCAATTGGATGAATGTATAG -201
AGAATCTCTCCGAATTACTCTATAACCTATAAATAATCTGTTGAATGGCTTGGTGTGGTAAATTTAGATAAATATTAAATCTCATGGTAACCTACTTTACATATTC

-200 GTATTTAATATGGGAGTAGGTTTATTTGTGATTTGAAGAAAGGATGCTCTAAGGCTCTCAACATTTTAAACATTTATATAGATACCAAGTATTATTGGTAAAGTCAC -90
CATAAATTATACCTCTCAAAAATAACACTAACATTTCTTTTCTACGAAGATCCGAGAGTGTAAATTTGTTAATAATCTATGGTCATAATAACCAATTTTCAGTGA

Hpa I 1

-89 GAAGATAAAATATTAAGAAATAAAAAACATTTAAAGACAAAATAATATCAATTTTAAATTTGGAGCTATCAATCTATAGAGAGGCTGTAAATTTGATAATAGCTCAGAGAGG -22
CTCTATTTTATAATTTCTATTTTGTAAATTTCTGTTTTATATAGTAAATTAACCTCGATAGTTATCATATCTTCCCAAAATTCAGCTATTATTCAGGCTCTCTTC
M I I S P E E E 8

Pst I

Bgl II

23 TAAAGTACTCATATAATAAACTACTAAATGCATTGGGAGTATCTGAGGAACATGCTAAAATACTGCTATGTAATTTGTATGCAGCATCTGAAAGGATTTACATCTCATG 133
TTCTAGTGAGTATTTATTTATGATTTCGTAACCTCATAGACTCTTGTACGATTTTATGACGCTACATTAACAACACTAGCTAGACTTTCTTAAATGTAGAGTAC
9 R S L I I K I L N A L G V S E E H A K I T A D V I V D A D L K G F T S H G 45

134 GTATTGGAAGATTTCCACAGTATGTTGAAGGTATTAAAGCTAGGTACTATAAAACATCAGGAAACATTTGAAATAGAAAAGAACAGACTCTGTTGCATGATAAAAGGTA 244
46 TAGTAGAGAAATCTGACCATCATCGTATTTCCGCTACTTTAAATCGTAACTCTTTCGATTTTATGACACACGCGTAACATCCGATGTAAGTAACTAGTAAATGACCTT
I G R F P Q Y V E G I K L G T I K T S G N I E I E K E T D S V A L I N G N 82

245 ATCATCTCTAGGACAGGTAGTAGCATATAAAGGCAATGAATTAGCAATTGAGAAAGCTAAAAATCTGGTTCGCGCATGTAGGCATACATGATTTCAATCATTTTGGAA 355
83 TAGTAGAGAAATCTGACCATCATCGTATTTCCGCTACTTTAAATCGTAACTCTTTCGATTTTATGACACACGCGTAACATCCGATGTAAGTAACTAGTAAATGACCTT
H L L G Q V V A Y K G M K K L A I E K A K N T G V G I V G I H D S N H F G I 119

356 TTGAGGATATTACTCAGACATGGCAATGAAATGACATGATTTGCAATTAAGTACTGACTAACACAGGACGCTGACCTCCATTGGGAGGTAAATACCAAGTATAGGTA 466
120 AAGCTCTATAATGAGCTGACCTGACTTTTACTGACTAAGCTTAATGATATGATTTGTGCTCGGTCGACATCGAGGTAAACCTCCATTTTATGGTCATAATCCAT
A G Y Y S D M A M K N D H I G I T M T N T E P A V A P L G G K I P V L G T 156

467 CAAATCTATAGCAATAAGTATTCATCAATGAGTATATGTTGCTGTGATGTCACTGCTGCGGTGCAAGAGGTAACTTTAGAAAGCTGCAAGAAAATGAAATGAA 577
157 GTTAGGATATGTTATTCATAGGTAGTTTACTCATAATACACGACACTATACAGTTGACGACGCAACGTTCTCCATTTGAAATCTTCGACGTCTTTTGGTCTT
M P I A I S I P S N E Y Y V A V D M S T A A V A R G K L L E A A R K M E K 193

578 AAATACCTGAGGCTATTGCAAGTACAAAAATGAAATCCAATACCGATCAAGTCAAGGCTTAAATGGATCAATTTTACCATTTGGAGGACAAAGGATATGCTTTAT 688
194 TTTATGGAATCCCAATCACTCATCTGTTTTTACCTTTAGGTCATGCTAGCTTTTCTCCCAATTTACCTAGTAAATGGTAACTCCTGTGTTTCCATACGAAATA
I P E G I A V D K N G N P T T D P N E A L N G S I L P F G G H K G Y A L C 230

689 GTTTATGATAGAAATTTCTGACGCTCTCTTGTTAAAGCAGAAATTTGGATCTAAGGTTAAAGGTACTGTAGACTCTTCCCAATGTGTACAAGGAGATTTACTCATAG 799
231 CAAATACTCTTTAAGAACCTCAGGAGAACCAATTTGCTTTAACTAGATTTCCAAATTTTACGACATGAGGAAGTGTACACATGTTTTCTCTAAATGAGTATC
F M I E I L A G P L V K A E F G S K V K G T V D P S Q M C T K G D L L I A 267

800 CTATAGATCCCTCAAAATTTTATGATATAGAAATTTAAAGAAATGTAGATGAATTTGTTAAAGAAATAAATCTACAGAAAGATGTTTAAATACCTGGAGATCGAG 910
268 GATATCTAGGAGTGTAAATACTATATCTTTCTTAAATTTCTTACATCTACTTAAACAATTTCTTTATTTAGATGCTCTTTCTACAAAATTTGACCTCTAGCTC
I D P S K F Y D I E E F K R N V D E F V K E I K S T G K D V L I P G D R E 304

Hind III

911 AACCAATGAATATCAAAAACGGGAGAGGAGGSCATAGAGTAGATATAAAGCTTGTGTAAAGTGTAAAGAAATAGCAGCAAGCTCAACATTTGAATCAATCAATCTGGTAA 1021
305 TTGCTTACTTATAGTTTTTGGCCCTTCTCTTCGATCTCGATCTATTTTCGAACAACTTTTCAACTTTCTTTATCGTCTGCTGAGTGTATGATTTGATGACCACTT
R M N I K K R E K E G I E L D K K L V E K L K E I A D E L N I E L T W 339

1022 AATTTTGAATCTAGTAGAGCTGTCTATGAAGGTATCAAAATGCTGGTATAGACTTTGTTGAAGTGTGCTTGTGATATTTATCTAAAGTATTTGAATTTAGTAGAAA 1132
TTAAACTTAGGATCATCTCGACAGATACTTCCATAGTTTTTACGACCATATCTGAACCAACTTCAACGGAACACATATAATAGATTTTCAATCACTTAATCATCTTTT

1133 TGATAAGATATACACATATACCGGTAAACAGAGAGAGAGGATTTGGCATTTGCTGTGGAGCTTACATTTGCTGAAAAATACTGCAATCTGATGCAAAATCTGG 1243
ACTATTTCTATATTTGTATATGGCATTTGTCTCTTCTCTTAAACCGTAAACGACGACCTCGAATGAACGACCTTTTTTATGAGGTATGACTACGTTTAAAGACC

1244 GCTGGGAACTCTGTAAATGACTTGCATCTCTTTATTTATTTTGGTATACCTATATTGATGGTTATAAGTCATAGAGGTACAAAAGSTGAAAAATAGAAGCAAAAT 1354
CGACCTTTGAGACATTTACATGAACGTAGAGAAATAAATAACCATATGGATATACTACCAATATTTCAGTATCTCCATGTTTTCCACTTTTTTATCTTCGTTGTTA

Pst I

1355 GCCTATGGGAATGCTACACCAAAAATTTACATCTCTTAAATTTCCAATTTTACGACGAAACAGCTCAG 1420
CGGATACCTTTACGATGTGGTTTTTAAATGTAAAGAAATTTAAAGGTTGAAATCTGGTCTTTGTCGACGCTC

So wurde durch Basenaustausche an Pos. -1 und +1 (Numerierung nach Abb. 34) sowohl eine einmalige Hpa I-Schnittstelle vor dem Gen eingefügt, als auch das Startcodon TTG zu ATG mutiert. Die Nukleotidsequenzen des dafür nötigen Mutagenese-Oligonukleotids ($OL_{45-AT_{-1,+1}CA}$) sowie der erforderlichen internen Sequenzierprimer werden ebenfalls in Abb. 34 dargestellt. Über die eingeführte Hpa I-Schnittstelle konnten die gewünschten Mutanten unter den Chloramphenicol-resistenten Klonen durch einfache Restriktionsanalyse erkannt werden. Entsprechend mußten nur Plasmide, die durch den Besitz der Schnittstelle bereits einen Hinweis auf die Mutation gaben, sequenziert werden.

In allen Plasmiden, die durch Hpa I geschnitten werden konnten (Laborbezeichnung: "WM") lag allerdings aus unbekannten Gründen eine zweite Mutation vor, durch die ein Teil der mdh-Gensequenz deletiert worden war. Diese unerwünschte Mutation wurde durch eine Rekombination mit dem kleineren Bgl II-Eco RI-Restriktionsfragment aus pMDH (Abb. 35) entfernt. Aus dem Produkt (Plasmid mutMDH) wurde (nach Absicherung der korrekten Nukleotidfolge durch Sequenzierung) mit einem Hpa I/Bam HI-Doppelverdau das mdh-Gen tragende Insert entnommen und mit dem Expressionsvektor pJF118EH rekombiniert, der wieder durch Eco RI-Schnitt, Auffüllen der Einzelstrang-Enden und Bam HI-Verdau für die Ligation vorbereitet wurde (s. auch 1.3.3.1). Das Expressionsplasmid pEX-MDH (Abb. 36; Anh. Abb. H) umfaßte 6731 bp und der Abstand zwischen ATG und RBS betrug 11 bp.

Abb. 35:

Schematisches Fließdiagramm zur Veranschaulichung des Rekombinationsvorgangs zur Eliminierung der unerwünschten Mutation im Plasmid "WM" bei der Konstruktion von Plasmid mutMDH.

Für das eingerahmte Restriktionsenzym (Hpa I) wurde die Schnittstelle mit gezielter Mutagenese geschaffen. Bei der Darstellung kurzer, aber für die Konstruktion wichtiger DNS-Abschnitte wurde auf eine proportionale Wiedergabe verzichtet.

Abb. 36:

Schematisches Fließdiagramm zur Konstruktion des mdh-Gen-tragenden Expressionsplasmids pEX-MDH.

Bei der Darstellung kurzer, aber für die Konstruktion wichtiger DNS-Abschnitte wurde auf eine proportionale Wiedergabe verzichtet.

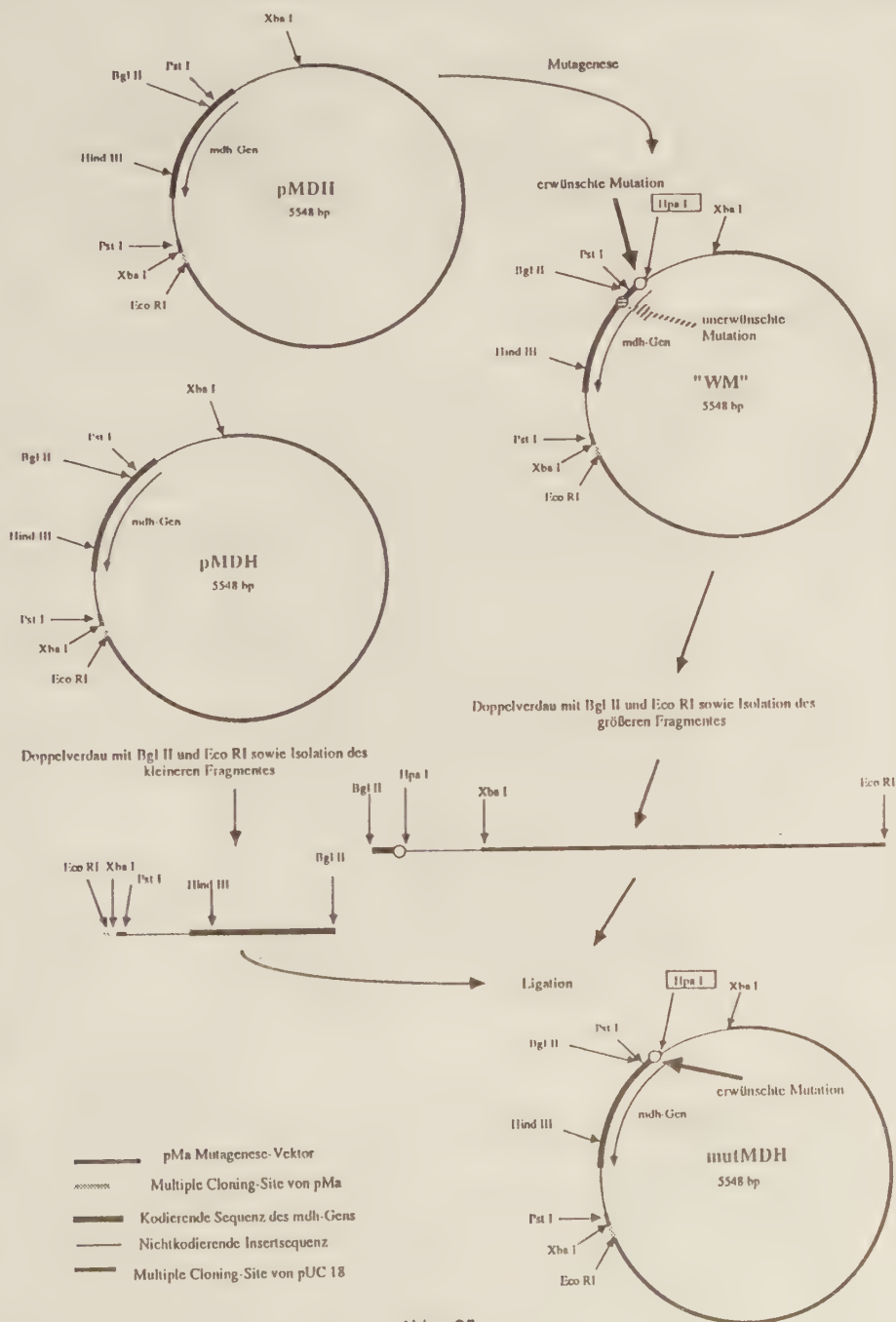


Abb. 35

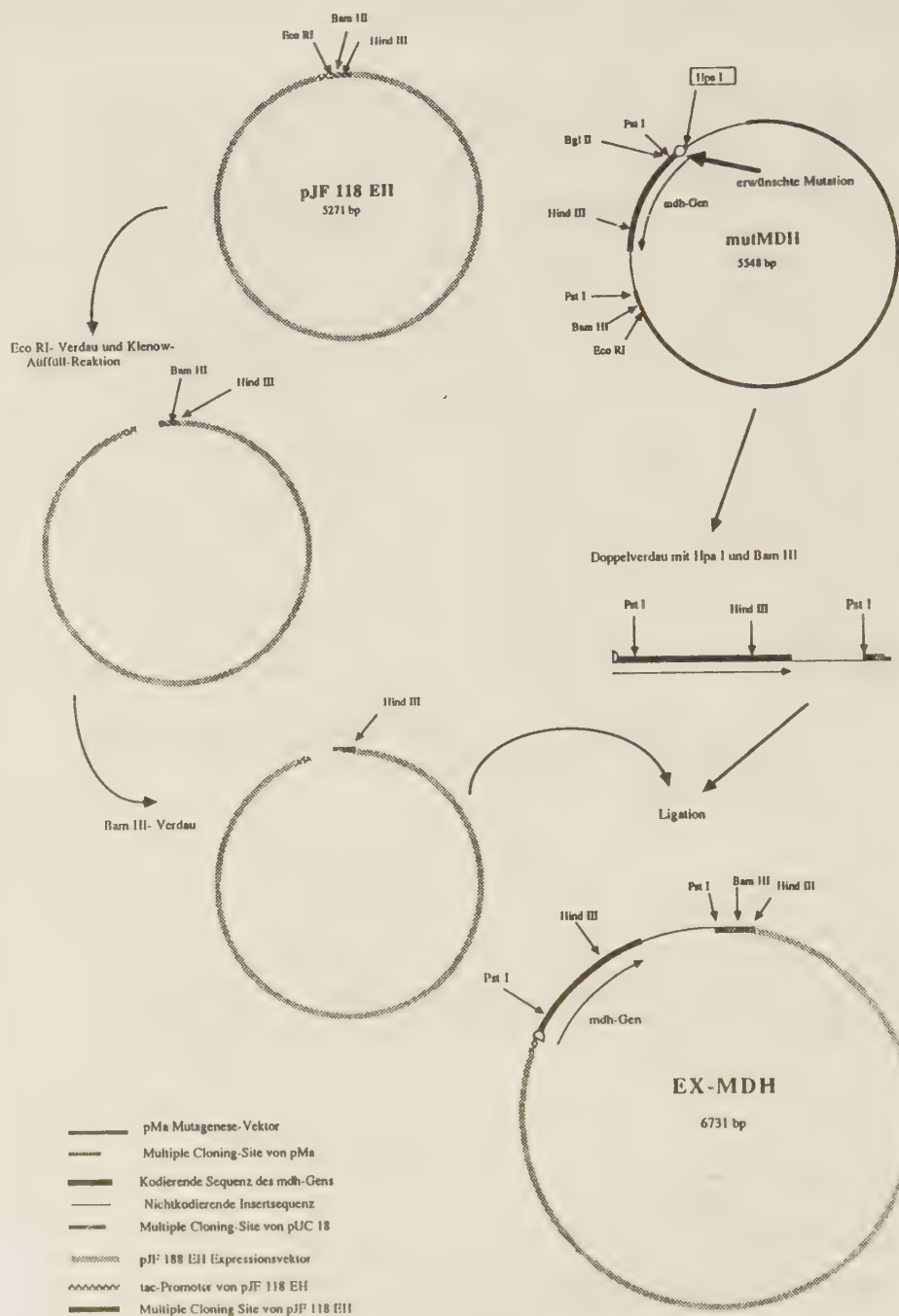


Abb. 36

2.2 Gewinnung von M. fervidus-MDH aus E. coli

Zur heterologen Expression des M. fervidus-mdh-Gens in E. coli wurden die gleichen experimentellen Bedingungen (Induktorkonzentration, Induktionszeitpunkt, Dauer der Expressionsphase) eingehalten, die auch für die Expression des gap-Gens von M. fervidus angewendet worden waren.



Abb. 37:
SDS-Polyacrylamid-Gel zur Veranschaulichung der Reinigung der M. fervidus-MDH aus E. coli.

Von links nach rechts: Längenstandard, Rohextrakt, Überstand nach Hitze-fällung, Überstand nach fraktionierter Ammoniumsulfat-fällung, Überstand nach Affinitätschromatographie.

Die Proteinedes Längenstandards sind (von oben nach unten): Myosin aus Kaninchenmuskel (MG=205000), β -Galaktosidase aus E. coli (MG=116000), Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel (MG= 97400), Rinder-Serumalbumin (MG= 66200), Ovalbumin (MG=42700), Rinder-Carboanhydrase (MG=31000) und Lysozym aus Hühnereiweiß (MG=14400).

Die Reinigung der MDH erfolgte über Hitzefällung, Ammoniumsulfat-Fraktio-
nierung und Affinitätschromatographie (Abb. 37, Tab. 17). Ausgehend von
13 g Naßzellen konnten nur 66 µg Protein erhalten werden. Nach Berück-
sichtigung der verschiedenen Reinigungsausbeuten berechnet sich die Menge
der in *E. coli* exprimierbaren *M. fervidus*-MDH damit nur zu 1/20 der
Proteinmenge an *M. fervidus*-GAPDH, die unter vergleichbaren Bedingungen
in *E. coli* synthetisiert wird.

2.3 Vergleich der in *E. coli* exprimierten *M. fervidus*-MDH mit dem Original-Enzym

Um festzustellen, inwieweit die heterolog exprimierte *M. fervidus*-MDH
phänotypisch mit dem Originalenzym übereinstimmt, wurden einige
kinetische Eigenschaften beider MDHs bestimmt und miteinander verglichen.
Wie Tab. 18 dokumentiert, zeigen die Enzyme in den untersuchten
Eigenschaften gute Übereinstimmung.

Tabelle 17

Reinigung der *M. fervidus*-MDH aus *E. coli*. Die Ausgangsmenge betrug 13 g Naßzellen. Die Aktivitäten
wurden mit NADP⁺ als Cosubstrat bestimmt. Eine eindeutige Aktivitätsmessung im Rohextrakt war nicht
möglich, so daß über die Anreicherung bei der Hitzefällung nichts ausgesagt werden kann.

	Volumen (ml)	U/ml	Gesamtak- tivität (U)	Proteingehalt (mg/ml)	spezifische Ak- tivität (U/mg)	Anrei- cherung	Aus- beute
Hitzefällung	36	0,02	0,8	1,5	0,013	-	100%
Ammonium- sulfatfraktio- nierung	3,6	0,2	0,8	2,44	0,082	6,3	100%
Affinitätschro- matographie (Dex- tranblau-Sepharose)	6,0	0,038	0,23	0,011	3,4	260	28%

Ferner konnte durch Ansequenzierung der ersten vier N-terminalen Aminosäurereste des *E. coli*-exprimierten Enzyms (durchgeführt im Labor Dr. F. Lottspeich, MPI für Biochemie, Martinsried) gezeigt werden, daß auch im Fall der heterolog exprimierten MDH das Start-Methionin unprozessiert bleibt.

Die erhaltenen Daten weisen somit darauf hin, daß beide MDHs phänotypisch nicht unterscheidbar sind.

Tabelle 18

Kinetische Parameter der *M. fervidus*-MDH aus einem exprimierenden *E. coli*-Klon im Vergleich mit dem Original-Enzym.

Variables Substrat	K_m (mM)		v_{max} (U/mg Protein)	
	Enzym aus <i>E. coli</i>	Originalenzym	Enzym aus <i>E. coli</i>	Originalenzym
Malat	0,155	0,150	2,4	2,7
Oxalacetat	0,2	0,2	60	61
NADH	0,005	0,0045	45	52
NADPH	0,016	0,014	49	52

Die Konzentration der invariablen Substrate betrug:

NAD⁺: 4 mM

NADH: 0,16 mM

Oxalacetat: 1,5 mM

Die Test-Temperatur betrug 41 °C

3. Die Primärstruktur der M. fervidus PGK

Die PGK ist das auf die GAPDH folgende Enzym in der Glykolyse. Durch sie wird das äußerst thermolabile 1,3-DPG unter ATP-Bildung in 3-PG überführt. Um Hinweise darauf zu erhalten, ob in thermophilen Organismen eine Tendenz zu beobachten ist, durch direkte Weitergabe hitzelabiler Intermediate zwischen konsekutiven Enzymen eines Stoffwechselweges ("substrate channeling") Hitzedestruktion dieser Metaboliten zu vermeiden, wurden in unserem Labor Untersuchungen zur GAPDH-PGK-Interaktion vorgenommen. Nachdem erste Ergebnisse (R. Hensel, nicht publiziert) tatsächlich eine Wechselwirkung zwischen GAPDH und PGK von M. fervidus anzeigten, sollten mit der Sequenzierung der PGK die Strukturaufklärungen vorangetrieben werden. Zudem wurde damit auch die Struktur-Funktions-Analyse an Enzymen von extrem thermophilen Archaeobakterien auf eine erweiterte Basis gestellt.

3.1 Klonierung und Sequenzierung des pgk-Gens

3.1.1 Aufbau und Screening einer angereicherten Genbank

Das N-terminale Ende der M. fervidus-PGK-Proteinsequenz wurde im Labor Dr. F. Lottspeich ansequenziert (Abb. 38). Für die Synthese eines Oligonukleotids zur Markierung des pgk-Gens wurde ein Teilbereich dieser Sequenz in die entsprechende Nukleotidfolge rückübersetzt (Abb. 39)

M F K F Y T M D D F D Y ? G ? R V L (V) R (V) D I N

Abb. 38:

N-terminale Sequenz der M. fervidus-PGK.

Die Fragezeichen stehen für nichtidentifizierte Aminosäurereste; in Klammern gesetzte Aminosäuren waren nicht sicher bestimmt worden.



Abb. 39:

Aminosäureteilsequenz vom N-Terminus der M. fervidus-PGK (oben) und die daraus abgeleitete Nukleinsäurefolge (unten)

Beim Codon für Threonin (=T) wurde in der dritten Position auf zwei der vier möglichen Basenvarianten verzichtet.

Angeregt durch eine Publikation von R.D. Nicholls (1986) wurde für die Klonierung des M. fervidus pgk-Gens eine neue Genbank mit vorselektierten chromosomalen Restriktionsfragmenten aufgebaut. Die Auswahl der Fragmente erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender Hybridisierung mit der Oligonukleotid-Sonde. Durch die gezielte Klonierung der signalgebenden Fragmente sollte eine höhere Ausbeute an pgk-Gen-tragenden Klonen und damit eine deutliche Material- und Zeitersparnis bei der Gensuche erreicht werden.

Für die Fragmentisolation wurde 1 µg chromosomale M. fervidus-DNS mit je 50 U Hind III oder Pst I vollständig geschnitten, im Agarosegel aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Nach Hybridisierung mit der Oligonukleotid-Sonde verblieb bei der höchsten Stringenz (45 °C) im Hind III-Verdau eine einzige Bande von ca. 3500 bp Länge, während der Pst I-Verdau kein eindeutiges Signal mehr ergab. Genomische Hind III-Fragmente im Größenbereich zwischen 3000 und 4000 bp wurden dann in pUC 18 ligiert und in E. coli JM 83 eingebracht. Nach Koloniehybridisierung der 122 resultierenden Transformanten verblieben 17 positive Klone, von denen sieben (1B1, 1D2, 1F8, 1A1, 2F6, 2G3, 3H5) ein identisches 3,3-kb-Insert besaßen, das lediglich in zwei verschiedenen Orientierungen ("vorwärts" bei 1B1, 1D2, 1F8 und 3G3, "rückwärts" bei den restlichen Klonen; vgl. Abb. 40) in die MCS des Vektors inseriert war. Dies entspricht einer Ausbeute von knapp 6% positiver Klone in der Genbank. Im Vergleich hierzu enthielten die 4250 Klone der repräsentativen Genbank nur zu durchschnittlich 0,14% die gesuchten Gene für die GAPDH (sechs Klone; vgl. 1.1.1.1), die MDH (acht Klone; vgl. E. Honka, Diplomarbeit

1989) und das S-Layer-Protein (sechs Klone; S. Fabry, G. Bröckl und H. König, Manuskript in Vorbereitung).

3.1.2 Die Sequenz des pgk-Gens

Nach Pst I-Verdau von Plasmid p1B1 und Religation des Vektor-haltigen 3,25 kb Subfragments verblieb ein signalgebendes 560 bp-Insert in pUC 18, welches direkter Sequenzierung zugänglich war. Die Sequenzanalyse ergab ca. 45 bp stromabwärts von der Hind III-Ligationsstelle den Beginn eines offenen Leserahmens, dessen übersetzte Aminosäurefolge mit der N-terminalen Sequenz der *M. fervidus*-PGK übereinstimmte.

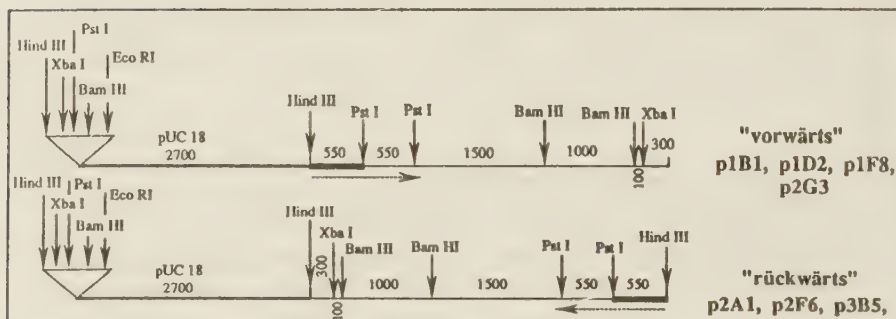
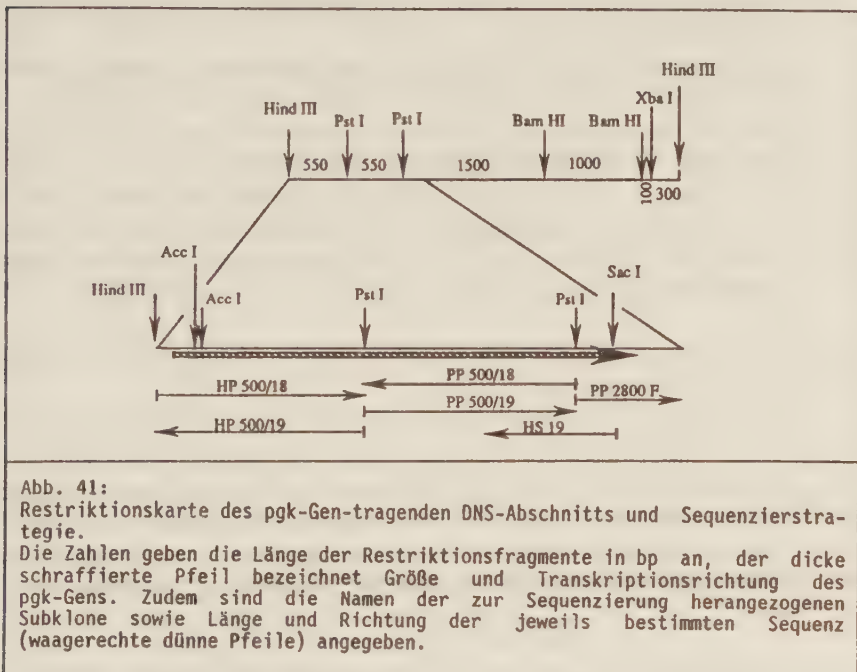


Abb. 40:
Restriktionskarten der *M. fervidus*-pgk-Gen-tragenden Plasmide aus der angereicherten Genbank.
Die Zahlen geben die Länge (in bp) der jeweiligen Restriktionsfragmente an. Das mit der Oligonukleotid-Sonde hybridisierende Pst I-Subfragment ist hervorgehoben. Der gestrichelte Pfeil bezeichnet Größe und Transkriptionsrichtung des pgk-Gens.

Bedingt durch die außerordentlich vorteilhafte Lage des *pgk*-Gens im *Hind* III-Fragment sowie durch günstige Restriktionsschnittstellen (*Pst* I, *Sac* I) konnte die vollständige Gensequenz durch die Teilsequenzen entsprechender Subfragmente bestimmt werden. Da die Auflösung der zunächst angewendeten Doppelstrang-Sequenzierung nicht ausreichte, wurde auch eine Einzelstrang-Sequenzierung mit den Phagenvektoren M13mp18 und M13mp19 durchgeführt. Die Sequenzierstrategie ergibt sich aus Abb. 41.



Beim Vergleich der Gensequenz mit der Sequenz der Oligonukleotid-Sonde wurde festgestellt, daß an einer Stelle eine Basen-Abweichung auftrat. Dies lag daran, daß bei der Konstruktion der Sonde an der dritten Position des Threonin-Codons (Pos. 60 in Abb. 42) zwei Varianten (G und C) außer acht gelassen worden waren. Eine entsprechende Präferenz im Codon-Gebrauch bei den bisher beschriebenen *M. fervidus*-Genen (vgl. Tab. 22, S. 125) hatte ein solches Vorgehen nahegelegt, um die Zahl der

Oligonukleotidvarianten zu reduzieren. Diese Fehlpaarung verhinderte jedoch eine spezifische Hybridisierung mit dem pgk-Gen nicht.

Wie Abb. 42 zeigt, umfaßt das pgk-Gen einen offenen Leserahmen von 1230 bp. Als Startcodon der Translation dient TTG (Pos. 43-45), ein Codon, mit dem bei M. fervidus auch das mdh-Gen eingeleitet wird (E. Honka, Diplomarbeit 1989). Die Termination erfolgt durch TAG. Dieses Stop-Signal wurde bei keinem der sonst bekannten M. fervidus-Gene (vgl. Tab. 22) bislang gefunden.

Vor dem Startcodon zeigt eine sechs Basen umfassende Sequenz (AGGAGG; Pos. 29-34 in Abb. 42) exakte Komplementarität zum 3'Ende der 16S rRNS-Konsensussequenz für methanogene Archaeobakterien (vgl. 1.1.2) und gibt damit einen deutlichen Hinweis auf eine RBS.

Der GC-Gehalt der kodierenden Region ist 31,7% und liegt damit im Bereich der GC-Werte für das Gesamtgenom. Wie in Punkt 1.1.2 bereits gezeigt, befolgt das pgk-Gen auch die für kodierende Sequenzen indikativen R/N/Y- und G/nichtG/N-Regeln (vgl. Tab. 2).

3.2 Die Aminosäuresequenz der PGK

Aus dem Gen wurde die Aminosäuresequenz der PGK abgeleitet (Abb. 42). Danach besteht das Enzym aus 410 Aminosäuren. Das errechnete Molekulargewicht (45870) wird durch die Molekulargewichtsbestimmung des Proteins durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (R. Hensel, pers. Mitteilung) bestätigt. Die Aminosäurezusammensetzung ist in Tab. 19 gezeigt.

3.3 Aminosäure-Sequenzvergleich mit anderen bekannten PGKs

Wie Tab. 20 zeigt, sind mit der in dieser Arbeit aufgeklärten Sequenz nunmehr auch PGK-Strukturen aus allen drei Urreichen des Lebens bekannt.

		Acc I	
1	GCCTTAGAGGAAGTATACTGAAATGTAAGGAGGATGATTTTGTTCAAATTCATACGATGGATGATTTTGATTATCTGGGAGCAGAGTGCTTGTAAAGACTACACATT		111
	<u>M F K F Y T M D D F D Y S G S R V L V R V D I</u>		23
		Acc I	
112	AATTCCTCAGTAGATCCTCATACTGGACCTATACCTTGATGATACGAGAAAGAGACATCAAAAACACTCAAGAAGCTAGTAGATGAAAGTCAAAAGTAGCTATTTTA		222
24	<u>M S P V D P H T G R I L D D T R M R L H S K T L K E L V D E H A K V A I L</u>		60
223	GCACATCAAGTAGGCCAGGAAAAAGAGATTTCACAACAATGGAAGAGCATAGTAAAGTATTATCCAATATATTAGATATGCTGTTACATATGTTGAGGATATATTGGT		333
61	<u>A H Q S R P G K R D F T T H E E H S K V L S H I L D M P V T Y V E D I F G</u>		97
334	TGTGCTGCACGACAATCAATAAGAAATATGGAAGATGAGATATCACTCTTTTAGAAAATGATAGTITTTTATTCAGAAAGAGTTTAAAAAGAGATCCCAAGTTCAGGCA		444
98	<u>C A A R E S I R M M E N G D I I L L E H V R F Y S E E V L K R D P K V Q A</u>		134
445	GAACACACCTTGAAGAAAAATTATCAAGTGTGTGATTATTATATAAATGATGCTTTTGCAGCTGCTCATAGATCACAACCATCATTAGTGGATTCCGCTTAAACTA		555
135	<u>E T H L L V R K L S S V V D Y Y I N D A F A A A H R S Q P S L V G F P L K L</u>		171
		Pst I	
556	CCTTCCTGCTCAGGAGGATTAAATGAAAGAGAAGTTAAACATTGTATAAAAATATAAAACGTTGAAAGCCATGTGTTATATTCTTGGAGGTGTTAAATGTATGAT		666
172	<u>P S A A G R L M E R E V K T L Y K I I K N V E K P C V Y I L G G V K I D D</u>		208
667	TCAATAATGATAATGAAAAATATTTAAAAAATGGTCTGCTGATTATATTCTAACATCTGGTGTGGTGGCAATGTATTTTAGAGGCTCTGGGATAGATATTAAGAA		777
209	<u>S I H I M K H I L K N G S A D Y I L T S G L V A H V F L E A S G I D I K E</u>		245
778	AAGACACAAAAATATTGTATAGAAAAATTAATAAAAAATTTATAAAAAATGGCAAAAACTTAAGATATAATATGGGAGAGATACTTACCCTGTGATGTGCCATA		888
246	<u>K H R K I L Y R K N Y K K F I K H A K K L K D K Y G E K I L T P V D V A I</u>		282
889	AATAAAATGGAAGAGAATTGATGTACCTATTGATGATATCTCTAACTTTCCAATATATGATATAGGCATGGAAGACTATAAATAATATATGAGAAAAATTAAGAGAGCA		999
283	<u>H K N G K R I D V P I D D I P N F P I Y D I G M E T I K I Y A E K I R E A</u>		319
1000	AAAACAATTTTGCTAATGGACAGCGGGCTTTTTCGAAGACAACAATTTAGTATAGGAAGTGAAGATTGTAAATGCAATGATCATCCAACGCATTTTCAGTTATA		1110
320	<u>K T I F A N G P A G V F E E Q Q F S I G T E D L L N A I A S S N A F S V I</u>		356
		Pst I	
1111	GCAGGAGGTCAITTAGCAGCGGCTGCAAAAAATGGGTATTTCAATAAAAAATATCATATTAGTAGTGAGGCGGGCTTGTATAGCATTTCTTTCTGGCGAAGAGCTC		1221
357	<u>A G G H L A A A A E K H G I S N K I N H I S S G G G A C I A F L S G E E L</u>		393
		Sac I	
1222	CCTGCAATTAAGTCTTGAAGAAGCTAGAAAAAGGAGCGATAATATATAGAACCTTTTAGTAAAAAGGAAGGGGTGAAAAACATGGCTCTAAAGCGTTAATTTT		1332
394	<u>P A I K V L E E A R K R S D K Y I</u>		
1333	ATTCCTTGCATATTTGTAGTTGGCGCAATTGGTGAGGATATTTCTCTACAGGGACAATAAATCACAAGTGGCTGTAGCAAAAA		1415

Abb. 42:

Nukleinsäure-Sequenz des pgk-Gen-tragenden DNS-Abschnitts sowie die abgeleitete Aminosäurefolge der *M. fervidus*-PGK.

Überstrichene Basen-Bereiche zeigen die Erkennungsregionen einiger charakterisierender Restriktionsenzyme an; der unterstrichene Abschnitt kennzeichnet die postulierte RBS. Die unterstrichene Aminosäuresequenz bezeichnet den Bereich, der durch N-terminale Proteinsequenzierung bestimmt worden war.

Tabelle 19

Aminosäurezusammensetzung der *M. fervidus* -PGK

Aminosäure	Mol% abgeleitet aus der Gensequenz
Ala	8,1
Arg	5,1
Asn	5,1
Asp	6,6
Cys	0,7
Gln	1,2
Glu	6,8
Gly	6,1
His	2,0
Ile	10,0
Leu	7,8
Lys	9,5
Met	2,9
Phe	3,9
Pro	3,7
Ser	6,6
Thr	3,4
Trp	0,0
Tyr	3,7
Val	6,8

Im Gegensatz zur GAPDH-Situation ist die Sequenzähnlichkeit zwischen der archaebakteriellen PGK und den eubakteriellen und eukaryontischen PGKs vergleichsweise hoch. Auffallend waren über den gesamten Bereich verteilte hochkonservierte Motive, die sich in allen bisher beschriebenen Sequenzen wiederfinden (z.B. "LLEN", Pos. 136-139; "NGP", Pos. 368-370; "GGA", Pos. 428-430; Positionsangaben nach Abb. 43). Dadurch war eine einfache Sequenzausrichtung ohne zusätzliche Hilfsmittel möglich (Abb. 43). Auf der Basis dieses Alignments wurde der Ähnlichkeitsgrad zwischen den verschiedenen PGK-Sequenzen als % Identität bzw. als % Homologie (Dayhoff, 1978) bestimmt (Tab. 21).

Tabelle 20

Strukturdaten zu allen bisher beschriebenen PGKs

Reich		Herkunft	Literaturverweis zur Primärstruktur	Literaturverweis zur Raumstruktur
Eukaryonten	Wirbeltiere	<i>Homo sapiens</i> (Muskel)	Michelson et al., 1983	n.b.
		<i>Homo sapiens</i> (Hoden)	McCarrey und Thomas, 1987	n.b.
		<i>Equus caballus</i> (Muskel)	Merrett, 1981	Banks et al., 1979
		<i>Mus musculus</i>	Mori et al., 1986	n.b.
	Pilze	<i>Aspergillus nidulans</i>	Clements und Roberts, 1986	n.b.
		<i>Penicillium chrysogenum</i>	van Solingen et al., 1988	n.b.
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hitzeman et al., 1982	Watson et al., 1982
	Protisten	<i>Trypanosoma brucei</i> (Cytoplasma)	Osinga et al., 1985	n.b.
		<i>Trypanosoma brucei</i> (Glycosom)	Osinga et al., 1985	n.b.
		<i>Crithidia fasciculata</i> (Cytoplasma)	Swinkels et al., 1988	n.b.
		<i>Crithidia fasciculata</i> (Glycosom)	Swinkels et al., 1988	n.b.
Eubakterien		<i>Thermus thermophilus</i>	Bowen et al., 1988	n.b.
		<i>Zymomonas mobilis</i>	Conway und Ingram, 1988	n.b.
Archaeobakterien		<i>Methanothermus fervidus</i>	diese Arbeit	n.b.

	1	20	40	60	80	100
HsM	MSLSNKLTLDKL	DVGKGRVVRVDFNVPHKN	...NQITNQRKAAPSVIKFLONGAKSVLHSHLRGPDGVPMPQKYSLEPVAVELKSLGK...			
Mm	MSLSNKLTLDKL	DVGKGRVVRVDFNVPHKN	...NQITNQRKAAPSVIKFLONGAKSVLHSHLRGPDGVPMPQKYSLEPVAVELKSLGK...			
TbC	MSLKERKSIINEC	DLKGGKVLIRVDFNVPLDQ	...GNTIDYRISALPAVQKVLTEGG	CVLHSHLRGPKGVSH	AEKELGSAGGIPGFEQKATLKP	
TbG	MTLNEKKSINEC	DLKGGKVLIRVDFNVPHKN	...GNTIDYRISALPTLKKVLTEGG	SCVLHSHLRGPKGIPM	AQAGK1RSTGGVPGQKATLKP	
Pc	MSLSNKLPTVD	DLKGRVLRVDFNVPLDEN	...VTMPQIRVIGALPTIKYALONGRAKAVLHSHLRGPDGK	NPKYSLKPVVPVLEELLGK		
An	MSLSNKLPTVD	DLKGRVLRVDFNVPLDQNTT	ITMPQIRVIGALPTIKYALONGRAKAVLHSHLRGPDGK	NPKYSLKPVVPVLEELLGK		
Sc	MSLSNKLPTVD	DLKGRVLRVDFNVPLDQ	...KKITSHQIRVIAALPTIKYELHPPRYVLASHLRGPNGR	NPKYSLAPVAKELQSLGK		
Taq	...HRTLLDL	DPKGRVLRVDFNVVPQD	...GKVDQETRIELSEPLRLHLAGGA	SILVLSHLGRPKG	PDPKYSLAPVGAELRAHLPE	
Zmo	...HAFRTLDD	IGOVKGRVLRVDFNVPMOG	...DRVTDDTLRAAIPVNLAEKAKVLILA	HFGKPGKP	NPENSLAKIDALAGVLR	
Mtf	...HFKFYTHDOF	DYSGSRVLRVDFNVSPDP	HTGRILDDTRHRLHSLTKELVDENAKVAILA	HQSPRGKROF	...THEEHSKVLNILD	
	120	140	160	180	200	
HsM	...DVLFLKDCVGP	VEKACANPAA	...GSVILLENLRFHVEEKGKQDASGNKVK	...AEPAKIDAFRASLSKL	GOVYVNDAGTAJRAHSHS	
Mm	...DVLFLKDCVGP	VENACANPAA	...GTVILLENLRFHVEEKGKQDASGNKVK	...AEPAKIDAFRASLSKL	GOVYVNDAGTAJRAHSHS	
TbC	VAKALSELLSRVIT	FAPDCLNAADVSKHSPGDVLL	ENVRFYKEEGSKKSTEEREMAK	ILSSYGVYISDAF	GAHRSATHTG	
TbG	VAKALSELLSRVIT	FAPDCLNAADVSKHSPGDVLL	ENVRFYKEEGSKK	KOREAMAK	LASYGVYISDAF	GAHRSATHTG
Pc	...SVITTEDCVGP	TEETVKNKASD	...GQVILLENLRFHAEEGSKDAEGKVK	...ADKADVD	SASLTALGOVYVNDAGTAJRAHSHS	
An	...SVITTEDCVGP	TEETVKNKASD	...GQVILLENLRFHAEEGSKDAEGKVK	...ADKADVD	SASLTALGOVYVNDAGTAJRAHSHS	
Sc	...SVITTEDCVGP	TEETVKNKASD	...GQVILLENLRFHAEEGSKDAEGKVK	...ADKADVD	SASLTALGOVYVNDAGTAJRAHSHS	
Taq	...ARFAPPPGSE	ARRAEALRP	...GEVILLENLRFHAEEGSKDAEGKVK	...KNDE	LARSYARLEGAFLVNDAGTAJRAHSHS	
Zmo	...PVNFINDIKGEA	AKKAVDALNP	...GAVILLENLRFHAEEGSKDAEGKVK	...KNDE	LARSYARLEGAFLVNDAGTAJRAHSHS	
Mtf	...HPVITYEDIFGCA	ARESTINEN	...GAVILLENLRFHAEEGSKDAEGKVK	...VQAEHLKRLSSVVDY	INDAGTAJRAHSHS	
	220	240	260	280	300	
HsM	...VCVNLPOKAGGFL	MKELELYAKALESPERPF	LATLGGKAVADKIQILNMLDK	...VNEHII	IGGGHAF	TLKVLNMMETGSLTDFEEGAKIVKDLMSKA
Mm	...VCVNLPOKAGGFL	MKELELYAKALESPERPF	LATLGGKAVADKIQILNMLDK	...VNEHII	IGGGHAF	TLKVLNMMETGSLTDFEEGAKIVKDLMSKA
TbC	...IPKILONGAAGYL	MEKESYFAGKILGNPPRL	VATVGGKVSOKIQLDMLQR	...IDYLI	IGGAMAYTFLK	AQGYISIGSMCEESKLEFARSLKKA
TbG	...IPKILONGAAGYL	MEKESYFAGKILGNPPRL	VATVGGKVSOKIQLDMLQR	...IDYLI	IGGAMAYTFLK	AQGYISIGSMCEESKLEFARSLKKA
Pc	...VGVDLPQKAGFL	VKKELELYAKALESPARFL	ATLGGKVSOKIPIVIMLKP	...VNSLI	IGGHAL	TFKKLTENYKIGNSLDFEAGSKILGEIVKA
An	...VGVDLPQKAGFL	VKKELELYAKALESPARFL	ATLGGKVSOKIPIVIMLKP	...VNSLI	IGGHAL	TFKKLTENYKIGNSLDFEAGSKILGEIVKA
Sc	...VGVDLPQKAGFL	VKKELELYAKALESPARFL	ATLGGKVSOKIPIVIMLKP	...VNSLI	IGGHAL	TFKKLTENYKIGNSLDFEAGSKILGEIVKA
Taq	...HVGFDLPQATAGFL	MEKELELYAKALESPARFL	ATLGGKVSOKIPIVIMLKP	...VNSLI	IGGHAL	TFKKLTENYKIGNSLDFEAGSKILGEIVKA
Zym	...HVGFDLPQATAGFL	MEKELELYAKALESPARFL	ATLGGKVSOKIPIVIMLKP	...VNSLI	IGGHAL	TFKKLTENYKIGNSLDFEAGSKILGEIVKA
Mtf	...LVFPLKLSAAGRL	HEREVKTLYIKINKEKPCVY	ITLGGKVDOSIMIMKMLKNGSADY	ITLSGLVANFLE	...ASGIDIKENHRL	ILYRKNYKFKIKMA
	320	340	360	380	400	
HsM	EKNQV	...KITLPDVFVTAADK	FENAKTQATVASCIPAGWMLDCG	PESSKYYAEVTRAKQ	IVNNGPVGVFEAEF	ARGTKSLMDEVVKATSR
Mm	EKNQV	...KITLPDVFVTAADK	FENAKTQATVASCIPAGWMLDCG	PESSKYYAEVTRAKQ	IVNNGPVGVFEAEF	ARGTKSLMDEVVKATSR
TbC	EDRKV	...QITLPIDHCHTE	FAVOSPLITE	DQNTPEGHMALD	GPRTIKYVQTI	IGKCSAITHNGPMGVFEHVPYSKGTFAIAKAMGRGT
TbG	EDRKV	...QITLPIDHCHTE	FAVOSPLITE	DQNTPEGHMALD	GPRTIKYVQTI	IGKCSAITHNGPMGVFEHVPYSKGTFAIAKAMGRGT
Pc	KKHNV	...EVLVPDVFVTAADK	FAVOSPLITE	DQNTPEGHMALD	GPRTIKYVQTI	IGKCSAITHNGPMGVFEHVPYSKGTFAIAKAMGRGT
An	KKHNV	...EVLVPDVFVTAADK	FAVOSPLITE	DQNTPEGHMALD	GPRTIKYVQTI	IGKCSAITHNGPMGVFEHVPYSKGTFAIAKAMGRGT
Sc	KAKGV	...EVLVPDVFVTAADK	FAVOSPLITE	DQNTPEGHMALD	GPRTIKYVQTI	IGKCSAITHNGPMGVFEHVPYSKGTFAIAKAMGRGT
Taq	EALGV	...RYLPEDDVAAER	IEAGVEVTRF	ARAPVPPVMTD	IGPKTREAF	ARALEGRFTVFNHNGPMGVFEHVPYSKGTFAIAKAMGRGT
Zmo	ETGCG	...KHLPSDDVAAER	KANPPIRTIP	VSQVADEN	ILDVGPRAVAL	TEVLKASKTLVWNGPLGAFETPEFDGVALAKAALLTKAGSL
Mtf	KKLKOKYGEKIL	TPDOVAI	...NKGKRI	IOVP	ITDIPN	FPYIDIGMETIKIYAEKIREAKTIFANGPAGVEEQEGISGTEDLNAISS
	420	440	460			
HsM	TIIGGGDTATCCAKWNT	EDKVSIVHSTGGGASLELLE	EKVLPGVDALSN			
Mm	TIIGGGDTATCCAKWNT	EDKVSIVHSTGGGASLELLE	EKVLPGVDALSN			
TbC	SIIGGGDSASAEEL	SGEAKRHSIVSTGGGASLELLE	EKVLPGVDALSN			
TbG	SIIGGGDSASAEEL	SGEAKRHSIVSTGGGASLELLE	EKVLPGVDALSN			
Pc	VIIGGGDTATVAAKYAEDK	ISHVSTGGGASLELLE	EKVLPGVDALSN			
An	VIIGGGDTATVAAKYAEDK	ISHVSTGGGASLELLE	EKVLPGVDALSN			
Sc	VIIGGGDTATVAAKYAEDK	ISHVSTGGGASLELLE	EKVLPGVDALSN			
Taq	TVVGGGDSAAVHRL	GLKGRF	SHVSTGGGASLELLE	EKVLPGVDALSN		
Zmo	SVAGGGDTAAAL	HHAGVAKO	SFVSTAGGAGFL	ENHMEKELPGVKALEA		
Mtf	SVIAGGIILAA	MEKMGISIK	INHIS	SSGGGACIAFL	SGEELPAIKVLE	EARKRSOKYI

Abb. 43:

Sequenzalignment von 10 verschiedenen PGKs.

Positionen, an denen zur Optimierung der Ausrichtung Lücken eingefügt wurden, sind mit Punkten gekennzeichnet.

Die Abkürzungen bedeuten:

HsM: *Homo sapiens*, Muskel; Mm: *Mus musculus*; TbC: *Trypanosoma brucei*, Cytoplasma; TbG: *Trypanosoma brucei*, Glycosom; Pc: *Penicillium chrysogenum*; An: *Aspergillus nidulans*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Taq: *Thermus thermophilus*; Zmo: *Zymomonas mobilis*; Mtf: *M. fervidus*.

Tabelle 21

Sequenzähnlichkeit zwischen den PGKs von Vertretern aller drei Urreiche. Ähnlichkeitswerte nach Dayhoff (1978): oberes Dreieck; Identitäten (%): unteres Dreieck.

	Homo sapiens, Muskel	Homo sapiens, Testis	Equus caballus	Mus musculus	Trypanosoma brucei	Trypanosoma brucei	Aspergillus nidulans	Crithidia fasciculata	Crithidia fasciculata	Saccharomyces cerevisiae	Thermus thermophilus	Zymomonas mobilis	Methanothermobacter fervidus
Homo sapiens, Muskel	93,7	98,9	98,9	45,0	45,1	62,4	46,3	46,2	65,4	46,8	39,2	25,8	
Homo sapiens, Testis	89,1	-	92,8	92,8	42,4	42,5	60,4	44,4	44,3	62,6	44,4	38,6	24,3
Equus caballus	97,8	87,7	-	98,5	44,2	44,3	62,0	45,8	45,7	64,6	45,9	38,3	25,5
Mus musculus	98,1	87,4	96,6	-	45,4	45,4	62,6	46,4	46,3	65,1	46,5	39,0	25,6
Trypanosoma brucei (Cytoplasma)	50,1	48,4	49,2	50,1	-	96,0	48,3	84,6	84,7	45,0	44,8	41,7	27,1
Trypanosoma brucei (Glycosom)	50,6	48,9	49,6	50,6	94,7	-	48,1	84,0	84,0	45,1	45,5	40,9	27,7
Aspergillus nidulans	64,2	62,7	63,9	63,7	52,1	53,3	-	47,6	47,6	72,1	49,3	43,6	29,3
Crithidia fasciculata (Cytoplasma)	52,3	51,3	51,8	52,1	80,4	80,9	53,0	-	99,9	45,1	45,4	42,1	26,8
Crithidia fasciculata (Glycosom)	50,1	51,1	51,6	51,8	80,6	81,1	53,3	99,8	-	45,2	45,3	42,1	26,7
Saccharomyces cerevisiae	66,6	63,7	65,9	65,6	50,8	52,1	70,5	50,8	51,1	-	48,7	42,2	28,4
Thermus thermophilus	49,6	48,2	48,4	48,9	49,6	50,6	48,4	50,1	49,9	49,6	-	48,7	31,1
Zymomonas mobilis	48,2	47,0	47,5	47,7	46,2	45,5	49,9	46,0	46,0	48,4	53,3	-	31,6
Methanothermobacter fervidus	39,5	38,7	38,5	39,2	40,0	40,4	40,0	40,2	40,0	40,0	40,7	40,2	-

Diskussion

1. Struktur und Organisation von M. fervidus-Genen

Mit der Nukleotidsequenz des gap-Gens wurde die erste vollständige Gensequenz aus M. fervidus beschrieben.

Inzwischen erhöhte sich die Anzahl bekannter M. fervidus-Gene auf weit über zehn: So konnte neben dem ebenfalls in der vorliegenden Arbeit beschriebenen pgk-Gen in unserer Arbeitsgruppe auch das mdh-Gen aufgeklärt werden (E. Honka, Diplomarbeit 1989; Honka et al., zur Publikation eingereicht); kurz vor dem Abschluß stehen darüberhinaus die Arbeiten zur Sequenzbeschreibung des S-Layer-Proteins (S. Fabry, G. Bröckl und H. König, Manuskript in Vorbereitung). Der Gruppe um John Reeve gelang es, das Methyl-Coenzym-M-Reduktase-Operon dieses thermophilen Methanogenen mit insgesamt fünf offenen Leserahmen zu sequenzieren (Weil et al., 1988) sowie in einer kürzlich erschienenen Arbeit die Sequenzen des 5S-rRNS Gens sowie zweier t-RNS-Operons vorzustellen (Haas et al., 1989). Die Zahl der vorliegenden Gene scheint damit ausreichend für einen Versuch, gemeinsame Merkmale sowohl in der Genorganisation als auch in der Genstruktur bei M. fervidus herauszuarbeiten und diese mit entsprechenden Merkmalen anderer Archaeobakterien zu vergleichen.

1.1 GC-Gehalt

In Übereinstimmung mit dem GC-Gehalt des M. fervidus-Genoms (33%, Stetter et al., 1981) wird innerhalb der von uns sequenzierten Strukturgene ein entsprechend niedriger GC-Wert gefunden (Tab. 2). Dies drückt sich auch im Codon-Gebrauch aus, der in Tab. 22 für alle bislang bekannten proteinkodierenden Gene und zwei ORFs unbekannter Funktion im Methyl-CoM-Reduktase-Operon (mcrD und mcrC) von M. fervidus zusammengestellt wurde. Man findet eine klare Bevorzugung von A und/oder T in den Wobble-Positionen; bei den Codonfamilien mit mehr als vier Mitgliedern (Arginin- und Serin-Codons) werden diejenigen mit einem hohen G- oder C-Anteil klar vermieden. CGC für Arginin wird beispielsweise in keinem der hier verglichenen Gene verwendet.

Tabelle 22

Codon-Gebrauch bei bisher bekannten Strukturgenen von *M. fervidus*. Angegeben ist die relative Verwendungshäufigkeit der Triplets in % sowie (in Klammern) die absolute Zahl der entsprechenden Codons im jeweiligen Gen.

AS	Codon	PGK	HEH	GAPDH	ORFs im Methyl-Coenzym-M Reduktaseoperon				
					B	D	C	G	A
Ala	GCC	6 (2)	8 (2)	0 (0)	2 (1)	0 (0)	6 (1)	0 (0)	2 (1)
	GCA	55 (18)	58 (15)	56 (14)	47 (23)	33 (1)	38 (8)	47 (7)	66 (41)
	GCT	36 (12)	35 (9)	36 (9)	47 (23)	67 (2)	50 (8)	40 (6)	27 (17)
	GCC	3 (1)	0 (0)	8 (2)	4 (2)	0 (0)	6 (1)	13 (2)	5 (3)
Arg	AGA	10 (2)	0 (0)	21 (3)	25 (4)	0 (0)	15 (3)	8 (2)	11 (3)
	AGA	75 (16)	63 (5)	71 (10)	69 (11)	75 (6)	54 (7)	88 (21)	78 (21)
	CGG	0 (0)	13 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	CGA	5 (1)	25 (2)	7 (1)	6 (1)	25 (2)	8 (1)	4 (1)	0 (0)
	CST	10 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	23 (3)	0 (0)	11 (3)
	CSC	6 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Asn	AAT	81 (17)	83 (15)	67 (10)	68 (13)	100 (2)	80 (4)	80 (4)	50 (9)
	AAC	19 (4)	17 (3)	33 (5)	32 (6)	0 (0)	20 (1)	20 (1)	50 (9)
Asp	GAT	96 (26)	74 (14)	81 (22)	76 (22)	100 (10)	89 (8)	81 (17)	57 (20)
	GAC	4 (1)	26 (5)	19 (5)	24 (7)	0 (0)	11 (1)	19 (4)	43 (15)
Cys	TET	100 (3)	100 (2)	67 (2)	100 (3)	0 (0)	67 (4)	0 (0)	100 (5)
	TTC	0 (0)	0 (0)	33 (1)	0 (0)	100 (1)	33 (2)	0 (0)	0 (0)
Gln	CAG	20 (1)	67 (2)	0 (0)	27 (3)	25 (1)	20 (1)	25 (2)	23 (5)
	GAA	80 (4)	33 (1)	100 (8)	73 (8)	75 (3)	80 (4)	75 (6)	77 (17)
Glu	GAG	21 (6)	27 (8)	19 (5)	19 (6)	29 (4)	35 (5)	13 (4)	14 (6)
	GAA	79 (22)	73 (22)	81 (22)	81 (26)	71 (10)	64 (9)	87 (28)	86 (36)
Gly	GGA	16 (4)	0 (0)	5 (1)	0 (0)	22 (2)	6 (1)	6 (1)	0 (0)
	GGA	44 (11)	55 (18)	38 (8)	54 (22)	33 (3)	45 (10)	63 (10)	53 (26)
	GGT	29 (7)	33 (11)	52 (11)	34 (14)	44 (4)	23 (5)	25 (4)	35 (17)
	GGC	12 (3)	12 (4)	5 (1)	12 (5)	0 (0)	14 (3)	6 (1)	12 (6)
His	CAT	87 (7)	83 (5)	86 (6)	56 (5)	50 (1)	80 (4)	80 (4)	78 (14)
	CAC	13 (1)	17 (5)	14 (1)	44 (4)	50 (1)	20 (1)	20 (1)	22 (4)
Ile	ATA	56 (24)	59 (22)	71 (22)	37 (11)	75 (9)	35 (6)	90 (9)	62 (16)
	ATT	37 (15)	34 (14)	28 (8)	53 (16)	25 (3)	47 (8)	39 (9)	38 (10)
	ATC	5 (2)	3 (1)	3 (1)	10 (3)	0 (0)	18 (3)	11 (2)	0 (0)
Leu	TTC	13 (4)	12 (3)	11 (2)	17 (7)	18 (2)	47 (7)	6 (1)	7 (3)
	TTA	37 (12)	35 (9)	63 (12)	56 (22)	36 (4)	27 (4)	53 (9)	41 (17)
	CTG	0 (0)	8 (2)	5 (1)	7 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1)
	CTA	13 (4)	15 (4)	11 (2)	7 (3)	0 (0)	13 (2)	6 (1)	34 (14)
	CTT	31 (10)	15 (4)	11 (2)	12 (5)	18 (2)	13 (2)	29 (5)	15 (6)
	CTC	6 (2)	15 (4)	0 (0)	0 (0)	18 (2)	0 (0)	6 (1)	0 (0)
Lys	AAG	13 (5)	15 (5)	15 (4)	12 (3)	27 (4)	25 (3)	7 (1)	8 (2)
	AAA	87 (34)	85 (28)	85 (22)	88 (22)	73 (11)	75 (9)	93 (14)	92 (24)
Met	ATG	92 (11)	90 (9)	100 (12)	100 (8)	100 (4)	100 (5)	100 (6)	100 (12)
	TTC	8 (1)	10 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Phe	TTT	75 (12)	100 (9)	86 (6)	77 (10)	86 (6)	100 (5)	71 (5)	57 (13)
	CTC	25 (4)	0 (0)	14 (1)	23 (3)	14 (1)	0 (0)	29 (2)	43 (10)
Pro	CDE	7 (1)	0 (0)	0 (0)	7 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (1)
	CCA	40 (6)	60 (9)	44 (7)	33 (5)	83 (5)	30 (3)	63 (10)	70 (16)
	CCT	47 (7)	33 (5)	50 (8)	60 (9)	71 (1)	50 (5)	37 (6)	26 (6)
	CCC	7 (1)	7 (1)	6 (1)	0 (0)	0 (0)	20 (2)	0 (0)	0 (0)
Ser	AGT	22 (6)	13 (2)	13 (2)	17 (4)	100 (1)	60 (3)	10 (1)	20 (5)
	AGC	7 (2)	0 (0)	7 (1)	9 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (2)
	TCS	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (1)	0 (0)	20 (1)	0 (0)	4 (1)
	TCA	38 (10)	56 (9)	33 (5)	48 (11)	6 (0)	20 (1)	50 (5)	32 (8)
	TCT	26 (7)	31 (5)	33 (5)	22 (5)	0 (0)	0 (0)	30 (3)	32 (8)
	TCC	7 (2)	6 (0)	13 (2)	0 (0)	0 (0)	9 (0)	10 (1)	4 (1)
Thr	ACE	14 (2)	0 (0)	5 (1)	6 (1)	20 (2)	8 (1)	20 (2)	3 (1)
	ACA	58 (8)	47 (8)	32 (6)	88 (14)	60 (6)	50 (6)	40 (5)	56 (18)
	ACT	21 (2)	47 (8)	58 (11)	6 (1)	20 (2)	25 (3)	40 (4)	28 (9)
	ACC	7 (1)	6 (1)	5 (1)	0 (0)	0 (0)	17 (2)	0 (0)	13 (4)
Trp	TGG	0 (0)	100 (1)	100 (1)	100 (1)	0 (0)	100 (1)	100 (1)	100 (7)
Tyr	TAT	100 (15)	88 (7)	73 (8)	73 (11)	100 (1)	75 (3)	80 (8)	79 (22)
	TAC	0 (0)	12 (1)	27 (3)	27 (4)	0 (0)	25 (1)	20 (2)	21 (6)
Val	GTG	7 (2)	0 (0)	9 (3)	5 (2)	18 (2)	9 (2)	8 (1)	8 (3)
	GTA	35 (10)	45 (10)	42 (14)	40 (17)	45 (5)	39 (9)	31 (4)	47 (17)
	GTT	37 (16)	50 (11)	42 (14)	50 (21)	36 (4)	43 (10)	46 (6)	39 (14)
	GTC	0 (0)	5 (1)	6 (2)	5 (2)	0 (0)	9 (2)	15 (2)	6 (2)
Stop	TGA	0	100	0	0	0	0	0	0
	TAG	100	0	0	0	0	0	0	0
	TAA	0	0	100	100	100	100	100	100

* Diese Werte wurden auf der Basis der Arbeit von Weill et al. (1988) berechnet

Da in den bisher analysierten intergenischen Regionen der GC-Anteil noch unter dem Durchschnittswert von 33% für das Gesamtgenom liegt (Hamilton und Reeve, 1985a, 1985b; Bollschweiler et al., 1985; der GC-Gehalt im intergenischen Bereich zwischen ORF-A und dem gap-Gen beträgt z.B. nur 17,5%), ist jedoch zu vermuten, daß das *M. fervidus*-Genom auch GC-reichere Gene oder Sequenzabschnitte enthält.

1.2 Transkriptionssignale

Eine vergleichende Analyse von Transkriptionssignalen wird insofern erschwert, als entsprechende molekulargenetische Untersuchungen zur eindeutigen Identifizierung von Promotoren und Terminatoren bei *M. fervidus* ausstehen. Mittelbare Hinweise auf Promotoren können allerdings durch Vergleich mit Konsensus-Sequenzen erhalten werden, die für methanogene Archaeobakterien abgeleitet wurden (Brown et al., 1989).

Konsensus:	<u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u>	
vor tRNS ^{Asp}	<u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u>	
vor tRNS ^{Thr}	<u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u>	
vor ORF>188	<u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u>	(75 bp bis ATG)
vor mdh-Gen	<u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u>	(117 bp bis TTG)
vor gap-Gen	<u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u>	(112 bp bis ATG)
vor S-Layer-Protein-Gen	<u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u>	(57 bp bis GTG)

Abb. 44:

Vergleich der Konsensus-Promotorsequenz für methanogene Archaeobakterien (eingerahmt; nach Brown et al., 1989) mit möglichen Promotorsequenzen verschiedener *M. fervidus*-Gene.

Die Sequenzen bei den tRNS-Genen und ORF>188 wurden aus Haas et al., 1989, entnommen, die Sequenz beim S-Layer-Protein-Gen ist unpubliziert (S. Fabry, G. Bröckl und H. König, in Vorbereitung). Die mit der Konsensus-Sequenz übereinstimmenden Positionen sind unterstrichen.

Wie in Abb. 44 gezeigt, werden in allen Fällen, in denen genügend Sequenzinformation aus dem Stromaufwärtsbereich der jeweiligen Gene vorliegt, Regionen mit guter Übereinstimmung zum Konsensus gefunden. Die gezeigte Sequenz entspricht der Box A archaebakterieller Promotoren (Zillig et al., 1988).

Insgesamt wird die Aussage dieses Vergleichs allerdings dahingehend eingeschränkt, daß der hohe AT-Anteil in den intergenischen Regionen des *M. fervidus*-Genoms Fehlinterpretationen begünstigt; für eine gesicherte Zuordnung ist eine experimentelle Bestätigung erforderlich.

Komplementärsequenz zum Konsensus des 3'-Endes me- thanogener 16S rRNS	AGGAGGTGAC	Start-Codon
gap-Gen	TGGAGGAATG	- 2 - ATG
mdh-Gen	AGAGGTGTT	- 3 - TTG
pgk-Gen	AGGAGGATGT	- 4 - TTG
Gen des S-Layer-Proteins	AGGAGGTGA	- 4 - GTG
mcr-B-Gen	AGGAGGTTAA	- 3 - ATG
mcr-G-Gen	AGGAGGTGTT	- 5 - ATG
mcr-A-Gen	AGGAGGTGTT	- 5 - ATG
ORF-B	ATAAGGAAC	- - - ATG
ORF>188	GAGTGGTTAT	- 1 - ATG
mcr-D-Gen	TGGGGGCAGG	- 2 - ATG
mcr-C-Gen	AAAACGTGAT	- 3 - ATG
ORF 258	AGGAGGAATG	- 2 - ATG

Abb. 45:

Mögliche Ribosomen-Bindungsstellen und die darauf folgenden Start-Codons bei *M. fervidus*-Genen.

Die Zahlen geben den Basen-Abstand zwischen RBS und Startcodon an; die mit der Konsensus-Komplementärsequenz übereinstimmenden Bereiche sind dünn eingerahmt. Als Quelle für die Sequenzen diente: Für gap-Gen, mdh-Gen, pgk-Gen und ORF-B: diese Arbeit; für mcr-A-, -B-, -C-, -D- und -G-Gen sowie ORF 258: Weil et al., 1988; für ORF>188: Haas et al., 1989; und für das Gen des S-Layer-Proteins: S. Fabry, G. Bröckl und H. König, in Vorbereitung.

Über archaeobakterielle Terminatorstrukturen liegen wenig gesicherte Information vor (z.B. Reiter et al., 1988; Culham und Nazar, 1989). Daher lassen sich auch noch keine verbindlichen Strukturgesetzmäßigkeiten ableiten. Eine Identifizierung von Terminatorstrukturen ohne experimentelle Befunde erscheint deshalb bei M. fervidus derzeit nicht möglich.

1.3 Ribosomenbindungsstellen

Die vergleichende Analyse von möglichen RBSn stützt sich demgegenüber auf eine breitere Informationsbasis (vgl. Abb. 45). Hier konnten vor allen Genen Sequenzmotive gefunden werden, die einer zur Konsensus-Sequenz des 3'-Endes der 16S-rRNS methanogener Archaeobakterien komplementären Basenfolge ähnlich sind. Die postulierten RBSn der Gene, für die ein Translationsprodukt nachgewiesen werden konnte (die beiden oberen Blöcke in Abb. 45) zeigen dabei erheblich bessere Übereinstimmungen als die der übrigen ORFs.

1.4 Translationsstart-Codons

Wie Abb. 45 zeigt, weichen die Start-Codons für das mdh- und pgk-Gen (Initiationssignal: TTG) sowie das Gen des S-Layer-Proteins von M. fervidus (Initiationssignal: GTG) vom üblichen ATG-Codon ab.

Nicht-ATG-Codons werden allgemein in allen drei Urreichen des Lebens gefunden. Während eine entsprechende Variabilität zunächst hauptsächlich bei den Eubakterien aufgefallen war (man beobachtet neben ATG - mit abnehmender Häufigkeit - GTG, TTG, ACG, ATT und ATA als Initiationscodons; vgl. Kozak, 1983; Khudyakov et al., 1988) häufen sich in neuerer Zeit auch entsprechende Befunde in eukaryontischen Systemen (vgl. z.B. Gupta und Patwardhan, 1988; Prats et al., 1989; Peabody, 1989; Florkiewicz und Sommer, 1989). Unter den Vertretern der Archaeobakterien schließlich steht M. fervidus mit seinen ungewöhnlichen Initiationscodons ebenfalls nicht allein: So fand man GTG bei den Genen für die Untereinheiten B' und C der RNS-Polymerase von Methanobacterium thermoautotrophicum (Berghöfer et al., 1988), beim ersten Gen des Methyl-CoM-Reduktase-Operons von Methanosarcina barkeri (Bokranz und Klein, 1987), beim Gen für die α -Untereinheit der ATPase von Methanosarcina barkeri (Inatomi et al., 1989) und beim gap-Gen von Pyrococcus

woesei (P. Zwickl, Diplomarbeit 1989); TTG wird weiterhin auch beim Gen für das Nitrogenase-Eisen-Protein von Methanococcus thermolithotrophicus (Souillard et al., 1988) und beim Gen für die Untereinheit A der RNS-Polymerase von Methanobacterium thermoautotrophicum (Berghöfer et al., 1988) gefunden.

Gemessen an der vergleichsweise geringen Anzahl bekannter archaeobakterieller Gene ist die Zahl der Abweichungen vom "gewöhnlichen" Start-Codon bei Archaeobakterien damit auffallend hoch. Über die biologische Bedeutung dieser Variabilität bei Archaeobakterien allgemein und bei M. fervidus speziell kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt allerdings nur spekuliert werden. Da alle vier M. fervidus-Genprodukte entweder wesentliche Bauelemente (S-Layer-Protein) oder Enzyme des Primärstoffwechsels sind (GAPDH, MDH, PGK) und Nicht-ATG-Codons normalerweise als schwache Translationssignale gelten (vgl. Reddy et al., 1985, Weyens et al., 1988), sind hier vielleicht andere Faktoren zur Aufrechterhaltung einer ausreichenden Translationseffizienz entscheidend. Ebenso wäre z.B. denkbar, daß unter dem Einfluß hoher Temperaturen oder hoher Ionenstärken die Art des Start-Codons keinen Einfluß auf die Translationseffizienz hat.

1.5 Operonorganisation

Die fortschreitenden Ergebnisse der Sequenzanalysen archaeobakterieller Genome geben zunehmend Hinweis darauf, daß sehr viele der Archaeobakterien-Gene, ähnlich wie bei Eubakterien, in Operons organisiert vorliegen. So sind z.B. Gene für die großen Untereinheiten der DNS-abhängigen RNS-Polymerase (Berghöfer et al., 1988; Leffers et al., 1989; Pühler et al., 1989b), für die Methyl-CoM-Reduktase- (Weil et al., 1988; Bokranz et al., 1988) und ATPase-Untereinheiten (Inatomi et al., 1989), für ribosomale Proteine und Elongationsfaktoren (Lechner et al., 1989) sowie für stabile RNAs (vgl. Übersicht bei Brown et al., 1989) bei entsprechend untersuchten Archaeobakterien-Spezies in Transkriptionseinheiten zusammengefaßt, wobei die Anordnung der archaeobakteriellen Cistrons z.T. exakt der in homologen Operons von Eubakterien entspricht. Diese Übereinstimmung ließ daher zunächst erwarten, daß bei den Archaeobakterien auch die glykolytischen Enzyme in Genclustern angeordnet sind. Da mit dem gap- und pgk-Gen von M. fervidus zum ersten Mal zwei

archaeobakterielle Gene konsekutiver glykolytischer Stoffwechselenzyme sequenziert worden sind, bot sich hier eine entsprechende Untersuchung an. Dabei konnte durch die Beschreibung des *pgk*-Gens gezeigt werden, daß dieses mit dem *gap*-Gen zumindest nicht in der Weise gekoppelt ist, wie dies bei *Zymomonas mobilis* (Conway und Ingram, 1988), *Bacillus stearothermophilus* (Branlant et al., 1989) und *Thermus thermophilus* (Bowen et al., 1988) der Fall ist: Bei diesen Eubakterien folgt das *pgk*-Gen jeweils dicht auf das *gap*-Gen, und zumindest für *Z. mobilis* konnte auch gezeigt werden, daß beide Gene unter der Kontrolle eines gemeinsamen Promotors stehen. Die physikalische Entkoppelung von *gap*- und *pgk*-Gen bei *M. fervidus* erinnert dagegen an die Situation, die in *E. coli* vorliegt (Riley und Anilionis, 1978). Hier kartiert das *gap*-Gen bei 38 min und das *pgk*-Gen bei 63 min auf dem Chromosom.

Gegen eine Operonorganisation der glykolytischen Enzyme von *M. fervidus* spricht ferner, daß sich für die Proteinsequenzen der beiden das *gap*-Gen stromauf- und -abwärts eingrenzenden ORFs keine Homologie zu irgendwelchen anderen Enzymen des Glukosestoffwechsels fand.

2. Heterologe Expression von *M. fervidus*-GAPDH und -MDH in *E. coli*

Die Möglichkeit, fremde Gene in heterologen Systemen zu exprimieren, hat erheblich zum Fortschritt der biotechnologischen Forschung beigetragen. So können pharmazeutisch oder biochemisch interessante Polypeptide, die von den Original-Organismen nur in sehr geringer Menge produziert werden, aus transformierten Mikroorganismen in großer Menge gewonnen werden. Dabei ist es gelungen, sowohl eubakterielle als auch eukaryontische Gene heterolog zu exprimieren und funktionsfähige Produkte im heterologen Wirt zu erhalten.

Für die Fremd-Expression archaeobakterieller Gene wurden bisher - mit der einzigen Ausnahme der gezielten Klonierung und Expression des Bacterio-Opsin-Gens von *Halobacterium halobium* in *E. coli* (Dunn et al., 1987; Karnik et al., 1987; Nassal et al., 1987) - nur "Schrotschuß"-Klonierungen vorgenommen, wobei man voraussetzte, daß archaeobakterielle Transkriptions- und Translationssignale auch im eubakteriellen System hinreichend erkannt werden bzw. daß funktionelle Fusionsprodukte mit eubakteriellen Proteinen entstehen (Wood et al., 1983; Cue et al., 1985;

Cram et al., 1985; Hamilton und Reeve, 1985a, 1985b; Reeve et al., 1986; Shuber et al., 1986; Weil et al., 1987; Bokranz et al., 1988; Sibold und Henriquet, 1988; Almond et al., 1989).

Mit der hier beschriebenen Expression der GAPDH und MDH von M. fervidus ist es erstmals gelungen, Enzyme eines extrem thermophilen Archaeobakteriums durch gezielte Rekombination des jeweiligen Gens in E. coli zu exprimieren und den Nachweis zu erbringen, daß das exprimierte Genprodukt phänotypisch mit dem Enzym aus dem Original-Organismus übereinstimmt.

Die erfolgreiche heterologe Expression in E. coli war dabei Grundvoraussetzung für die experimentelle Eingrenzung von Thermophilie-spezifischen Strukturmerkmalen durch gezielte Mutagenese. Dieses Vorgehen erforderte, daß gezielt veränderte Proteine für die Analyse von Struktur-Funktionsbeziehungen zur Verfügung standen. Besondere Bedeutung kommt daher dem Befund zu, daß die in E. coli exprimierte GAPDH und MDH einen zum Enzym des Original-Organismus identischen Phänotyp besitzen. Die mesophile Umgebung in E. coli behindert offenbar die korrekte Faltung der Polypeptidkette nicht. Somit war auch nicht mit einer milieubedingten Veränderung der verschiedenen Muteine zu rechnen, die nichts mit den gezielten Strukturveränderungen zu tun hat.

Bei der quantitativen Analyse der Expression von M. fervidus-GAPDH und -MDH in E. coli fiel auf, daß die Expressionsrate ziemlich gering war: So lag der Anteil der exprimierten GAPDH am Gesamtzellprotein bei 1%, der der MDH sogar nur bei 0,05%; mit einem Hochexpressionsvektor könnten aber durchaus Werte von 20-30% erwartet werden (vgl. z.B. Tomich et al., 1989, Nobuhara et al., 1988). Diese auffallend niedrigen Expressionsraten werfen einige Fragen nach den limitierenden Ursachen auf.

Zu expressionsbeeinflussenden Variablen - allgemein als auch speziell im Hinblick auf Fremdexpression - liegen umfangreiche Untersuchungen vor. Eine große Rolle für die Translationseffizienz spielen demnach unter anderem folgende Faktoren:

(i) der Codon-Gebrauch (vgl. z.B. Sörensen et al., 1989);

(ii) der Abstand zwischen dem Start-Codon und der RBS: Hier fanden z.B. Curry und Tomich (1988) bei der Expression des menschlichen Renin-Gens in

E. coli einen Optimalabstand von 8 bp und Dalbøge et al. (1988) bei der Fremdexpression modifizierter menschlicher Wachstumshormone die beste Distanz um 11 bp,

(iii) der Basenkontext um das Start-Codon: Eine Häufung von Adenin-Basen unmittelbar stromauf- und stromabwärts vom Initiations-Signal begünstigt nach Nobuhara et al. (1988) oder Dalbøge et al. (1988) die Translationsrate; zudem ist, wie bereits in Punkt 1.4 diskutiert, die Art des Start-Codons selbst entscheidend,

(iv) die Sekundärstruktur in der Umgebung des Start-Codons: So konnten kürzlich Tomich et al. (1989) in einer systematischen Analyse der Expressionsrate von Rinder-Somatotropin in E. coli zeigen, daß die Möglichkeit zur Ausbildung von Stem-Loop-Strukturen in unmittelbarer Nähe des ATG die Translationsinitiation drastisch einschränkt.

Für den relativ niedrigen M. fervidus-GAPDH-Spiegel in induzierten E. coli-Zellen dürfte wohl vor allem der Codon-Gebrauch verantwortlich sein. Das M. fervidus-Gen besitzt einen erheblich niedrigeren GC-Anteil (34%) als für durchschnittliche E. coli-Gene bekannt ist (um 50% GC). Die daraus resultierende unterschiedliche Codon-Präferenz zwischen M. fervidus und E. coli kann daher durchaus als Erklärung für die schlechte Transkriptionseffizienz dienen (vgl. z.B. Ernst, 1988, für den Codon-Gebrauch in hochexprimierten E. coli-Genen mit Tab. 22). Diese Vermutung wird durch einen neuen Befund unserer Arbeitsgruppe bestärkt: Das gap-Gen des ultrathermophilen Archaeobakteriums P. woesei hat mit 40% GC einen GC-Gehalt, der dem des Eubakteriums E. coli erheblich näher kommt (P. Zwickl, Diplomarbeit 1989); die Expression dieses Gens ist zehnmal höher als die der M. fervidus GAPDH (C. Bogedain, pers. Mitteilung).

Die Distanz zwischen RBS und ATG stellte zwar keinen limitierenden Faktor bei der Expression des M. fervidus-gap-Gens dar, hatte aber doch einen deutlichen Einfluß auf die Expressionsrate. Bei der Rekombination des gap-Gens mit dem Expressionsvektor wurde einmal die von Curry und Tomich (1988), zum anderen die von Dalbøge et al. (1988) geforderte Optimaldistanz eingehalten (8 bp bei pJFgap-1, 10 bp bei pJFgap-2). Das Konstrukt mit dem längeren Abstand erlaubte eine doppelt so hohe

Expression.

Für die extrem schlechte Expressionsrate der *M. fervidus*-MDH (1/20 der GAPDH-Menge) müssen allerdings noch weitere Limitationen angenommen werden. In bezug auf den GC-Gehalt unterscheiden sich *mdh*- und *gap*-Gen praktisch nicht und bei der Konstruktion des Expressionsvektors EX-MDH wurde ein günstiger Abstand von 11 bp zwischen RBS und ATG erzielt. Auch hinsichtlich der Anzahl von Adenin-Basen, die im Anschluß an die RBS von pJF118EH (=AGGAA) bis einschließlich des dritten kodierenden Triplets der Gene vorliegen, ergibt sich für EX-MDH mit 55% (11 von 20 Basen sind A) ein eher noch höherer (die Expression begünstigender) Anteil als für Plasmid pJFgap-1 (47%) und pJFgap-2 (42%) (vgl. Anh. Abb. A, Abb. E, Abb. H). Und schließlich war das natürliche Start-Codon TTG des *mdh*-Gens vor Überführung in den Expressionsvektor zu ATG mutiert worden.

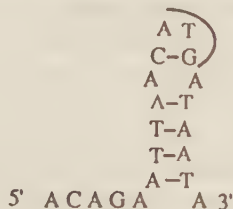


Abb. 46:

Mögliche Sekundärstrukturausbildung im Fusionsbereich zwischen dem Expressionsvektor pJF118EH und dem *M. fervidus*-MDH-Gen. Das Startcodon des MDH-Gens ist mit einem Bogen gekennzeichnet.

Somit muß ein anderer Grund für die mäßige MDH-Expression vorliegen. Hier mag vordergründig natürlich schon die Tatsache eine Rolle spielen, daß die äußeren Bedingungen der Expression (Induktorkonzentration, Induktionszeitpunkt usw.) vom GAPDH-System unverändert übernommen und nicht für die MDH optimiert worden waren. Eine Strukturanalyse des Basenkontextes um das MDH-Start-Codon ergab allerdings, daß die Translationseffizienz möglicherweise hauptsächlich durch die Ausbildung einer das Start-Codon einschließenden Sekundärstruktur (vgl. Abb. 46) beeinträchtigt wird.

3. Betrachtungen zur Thermoadaptation bei archaebakteriellen GAPDHs

Die M. fervidus-GAPDH war die erste von bisher vier archaebakteriellen GAPDHs, deren Primärstrukturen in unserem Labor aufgeklärt wurden. Mittlerweile existiert Sequenzinformation von den Enzymen der mesophilen Methanogenen M. bryantii und M. formicicum (Wachstumsoptimum: 37 °C) (J. Biro, Dissertation 1989), des extrem thermophilen M. fervidus (Wachstumsoptimum: 83 °C) und des ultrathermophilen P. woesei (Wachstumsoptimum: 100 °C) (P. Zwickl, Diplomarbeit 1989), so daß sich mit dem Vorliegen dieser Sequenzen die Erwartung verband, durch einen Primärstrukturvergleich der an so verschiedene Temperaturbereiche angepaßten Enzyme Thermophilie-spezifische Strukturmerkmale zu erfassen. Dies erschien insofern berechtigt, als die hohe Sequenzähnlichkeit zwischen den Enzymen der mesophilen Methanbakterien (M. bryantii, M. formicicum) und des extrem thermophilen M. fervidus eine Überlagerung der Thermophilie-spezifischen Merkmale durch phylogenetisch bedingte Strukturunterschiede weitgehend ausschließen dürfte.

3.1 Sequenzvergleich unter dem Aspekt der Thermophilie

Beim Sequenzvergleich archaebakterieller GAPDHs wurden drei unterschiedliche Paarungen vorgenommen (Tab. 23). Dabei verfolgt der Vergleich zwischen den Enzymen des mesophilen M. bryantii und des extrem thermophilen M. fervidus die Temperaturadaptation im Bereich von 37-83 °C und der Vergleich zwischen den GAPDHs von M. fervidus und P. woesei die Temperaturanpassung von 83-100 °C. Der Vergleich zwischen der M. bryantii- und P. woesei-GAPDH schließlich reflektiert die Gesamtanpassung von 37-100 °C.

In bezug auf die beobachtbaren Aminosäure-Nettoaustausche ist die Thermoadaptation zwischen 37 °C und 83 °C vor allem durch den Zugewinn von Ile, aber auch von Ala und Asp gekennzeichnet, während Gly, Leu und Ser auffallend vermieden werden (Tab. 23, Spalte 1).

Dabei ist die Zunahme von Ile sehr häufig auf den Austausch gegen ein "mesophiles" Leu zurückzuführen und Ala nimmt auf Kosten von Ser zu, während als Ersatz für Gly im thermophilen Enzym einige verschiedene Aminosäuren (Asp, Ala, Asn) in Frage kommen. Auf keinen bevorzugten Austausch geht die Anreicherung von Asp im thermophilen Enzym zurück (Tab. 23, Spalte 2).

Bei Übergang von 83 °C nach 100 °C (Tab. 23, Spalte 3 und 4) kann in bezug auf die Nettoaustausche hauptsächlich ein Zugewinn von Phe im ultrathermophilen Enzym beobachtet werden; daneben steigt auch der Ala-, Glu- und Lys-Anteil. Es wird kein weiterer Zugewinn an Ile beobachtet. Auffallender ist ferner die häufige Vermeidung von Asp; diese Aminosäure wird oft durch Asn, Glu und Pro ersetzt.

Durch den dritten Vergleich (*M. bryantii*-P. woesei; 37-100 °C) wird die Summe der Veränderungen ersichtlich (Tab. 23, Spalte 5 und 6).

Unter dem Aspekt einer konformellen Stabilisierung der thermophilen Proteine lassen sich folgende Beobachtungen machen:

(i) Es erfolgt eine Steigerung der Hydrophobizität; der dabei verfolgte Weg ist jedoch je nach Temperaturbereich differenziert und verläuft beim Übergang von 37 °C nach 83 °C über einen Ile-Zugewinn, von 83 °C nach 100 °C über den Einbau von Phe.

(ii) Die Kettenflexibilität nimmt ab; dies geschieht durch Vermeidung kleiner oder wenig sperriger Reste zugunsten größerer, sperrigerer. Eine solche Tendenz wird vor allem beim Übergang von 37 °C nach 83 °C durch Austausch von Gly deutlich, und auch der Eintausch einer Aminosäure mit Verzweigung an C β (Ile) statt an C γ (Leu) kann im gleichen Zusammenhang gesehen werden.

Beim Übergang von 83 °C nach 100 °C scheinen ferner Austausche vorzuliegen, die im Hinblick auf die Stabilisierung der kovalenten Struktur interpretiert werden müssen. So wird die auffallende Reduktion von Asp im ultrathermophilen Protein verständlich, wenn man die Tatsache berücksichtigt, daß Asp-haltige Peptidbindungen bei Temperaturen über 90 °C verstärkter Hydrolyse unterliegen (Ahern und Klivanov, 1985). Eine Vermeidung der bei höheren Temperaturen als thermosensitiv geltenden

schwefelhaltigen Aminosäuren (Met, Cys; die Empfindlichkeit ist allerdings hauptsächlich unter aeroben Bedingungen gegeben, mag aber auch bei Schwankungen im intrazellulären Redoxpotential der Archaeobakterien eine temporäre Rolle spielen) ist ebenfalls erst beim Übergang 83-100 °C beobachtbar.

Der Weg, den die archaeobakteriellen GAPDHs bei ihrer Thermoadaptation beschreiten, entspricht nach den Ergebnissen dieser Sequenzvergleiche nur teilweise den "etablierten" Strategien, die aus anderen Analysen abgeleitet wurden.

So besteht Übereinstimmung in der Tendenz, die Gesamthydrophobizität im Zuge der Thermoadaptation zu steigern; dies wurde sowohl aufgrund statistischer Analysen von Proteinen z.T. sehr weitläufig verwandter Organismen (Argos et al., 1979; Merkler et al., 1981; Argos, 1989) als auch durch Vergleich von Enzymhomologen eng verwandter Eubakterien (Sidler et al., 1986; Pauptit et al., 1988; Zuber, 1988) beobachtet. Ferner finden sich analoge Wege in bezug auf die Reduktion der Kettenflexibilität (Vihinen, 1987) bzw. die Reduktion der Auffaltungsentropie (Matthews et al., 1987) durch Einbau größerer und sperrigerer Aminosäurereste in die thermophilen Enzyme.

Daß archaeobakterielle und eubakterielle Enzyme hier gleiche Wege beschreiten, zeigt exemplarisch der Vergleich einiger physikalischer Sequenzparameter (Hydrophobizitätsindex nach Tanford, 1962; Flexibilität nach Karplus und Schulz, 1985) bei den drei Archaeobakterien-GAPDHs und den GAPDHs von drei Eubakterien (Bacillus) mit unterschiedlichem Temperaturspektrum (Tab. 24).

Ein essentieller Unterschied betrifft jedoch die Beobachtung, daß bei eubakteriellen thermophilen Enzymen das Verhältnis von Arg/Lys generell erhöht ist (Merkler et al., 1981; Argos, 1989); dies gilt sogar als ein Kennzeichen struktureller Protein-Thermoadaptation schlechthin (Argos, 1989). Die Archaeobakterien-GAPDHs folgen der Regel aber nicht (vgl. Tab. 24); beim Übergang von 37 °C nach 83 °C wird keine Zunahme, beim Übergang von 83 °C nach 100 °C dagegen sogar noch eine Abnahme dieses Quotienten beobachtet.

Ob diese Abweichung ein generelles archaeobakterielles Kennzeichen ist oder vielleicht im Zusammenhang mit anderen stabilisierenden Prinzipien

gesehen werden muß, bleibt zu klären. Beispielsweise könnte eine Beziehung zur intrazellulären Ionenkonzentration bei M. fervidus bestehen. Sowohl GAPDH als auch MDH erreichen erst bei hoher Ionenstärke die Thermostabilität, die für das Leben bei über 80 °C erforderlich ist (Fabry und Hensel; 1987, Hensel und König, 1988). Die M. fervidus-MDH besitzt dabei einen noch niedrigeren Arg/Lys-Quotient (0,24; E. Honka, Diplomarbeit 1989) als die GAPDH und die PGK (Arg/Lys=0,54). Damit scheint Arg zumindest bei der strukturellen Thermoadaptation von M. fervidus-Enzymen nicht die Rolle zu spielen, die es bei eubakteriellen Enzymen hat.

Für den Aussagewert der bisherigen Diskussion ist es allerdings noch ganz entscheidend, auszuschließen, daß die auf der Proteinebene beobachteten Aminosäure-Unterschiede vielleicht nur Ausdruck einer Thermoadaptation auf Nukleinsäure-Ebene sind. Es wäre z.B. denkbar, daß höhere Wachstumstemperaturen im Rahmen der Stabilisierung des DNS-Doppelstrangs bzw. der Codon-Anticodon-Wechselwirkung bei der Translation generell oder punktuell zur Erhöhung des GC-Anteils in der Gensequenz führen und damit dem Genprodukt in den Grenzen des für seine Funktion tolerierbaren Bereichs bestimmte Aminosäure-Austausche aufzwingen.

Tabelle 24

Vergleich des Arginin/Lysin-Verhältnisses und verschiedener physikalischer Summenparameter von GAPDHs aus Archaeobakterien und Eubakterien mit verschiedenen Wachstums-optima

Organismus	optimale Wachstumstemperatur (°C)	Arg/Lys-Verhältnis	Hydrophobizitätsindex (kcal)	Flexibilität
<i>M. bryantii</i>	37	0,54	1,068	1,0007
<i>M. fervidus</i>	83	0,54	1,135	0,9957
<i>P. woesei</i>	100	0,48	1,195	0,9909
<i>B. subtilis</i>	37	0,50	0,939	0,9942
<i>B. stearothermophilus</i>	55	0,65	1,064	0,9910
<i>T. aquaticus</i>	70-75	0,70	1,128	--- *

* aufgrund unvollständiger Sequenzinformationen nicht bestimmbar

Wie Tab. 25 zeigt, ist dies für die Gensequenzen der drei archaebakteriellen GAPDHs, auf die sich die obige Diskussion stützt, jedoch nicht der Fall. So liegt der GC-Gehalt des gap-Gens von M. fervidus mit 34% weit unter dem entsprechenden Wert für das M. bryantii-gap-Gen, und das P. woesei-gap-Gen zeigt ebenfalls keinen höheren GC-Gehalt. Auch bei der detaillierten Betrachtung des G- und C-Anteils in den ersten beiden Positionen der Codons kann schließlich keine Anhäufung von G oder C in den thermophilen Genen festgestellt werden. Die beobachteten Aminosäureaustausche sind somit allein Ausdruck der Thermoadaptation der Proteine und nicht Folge einer Temperaturanpassung auf Nukleinsäure-Ebene.

Tabelle 25

Anzahl der Basen in den gap-Genen dreier Archaeobakterien, bezogen auf ihre Position in den Codons.

Organismus	Positionsnummer im Codon	Base			
		A	C	G	T
M. bryantii	1	111	50	130	48
	2	117	20	51	100
	3	132	30	44	106
	Gesamt	360	178	225	254
M. fervidus	1	119	37	133	48
	2	121	72	42	102
	3	153	27	33	124
	Gesamt	393	136	208	274
P. woesei	1	123	43	129	39
	2	119	66	46	103
	3	122	59	60	93
	Gesamt	364	168	235	235

3.2 Gezielte Mutagenese zur Eingrenzung der Thermophilie-spezifischen Strukturmerkmale der M. fervidus-GAPDH

Der Einsatz gezielter Mutagenese zur Aufklärung von Struktur-Funktions-Beziehungen setzt im allgemeinen die genaue Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des jeweiligen Proteins voraus. Bei der Abschätzung der strukturellen Konsequenzen von Mutationen an der M. fervidus-GAPDH sind wir jedoch bisher darauf angewiesen, auf Raumstruktur-Modelle der GAPDHs von B. stearothermophilus, Homarus americanus bzw. Homo sapiens (Literatur s. Tab. 5) Bezug zu nehmen, da entsprechende Analysen bei der M. fervidus-GAPDH im Detail noch nicht durchgeführt werden konnten. Der ersatzweise Rückschluß auf die bekannten Strukturen erscheint aber insofern gerechtfertigt, als die Profile der physikalischen Parameter Amphipathie, Flexibilität und Hydropathie deutliche Hinweise darauf geben, daß bei M. fervidus eine Sekundärstruktur-Anordnung vorliegt, die der von eubakteriellen bzw. eukaryontischen GAPDHs sehr ähnlich ist.

Durch die gezielte Mutagenese sollten an bestimmten Positionen der M. fervidus-GAPDH Aminosäurereste, die für das mesophile Enzym von M. bryantii charakteristisch sind, eingetauscht und der Einfluß der entsprechenden Substitutionen auf die Stabilität und Aktivität des Enzyms geprüft werden. Im Zentrum des Interesses stand dabei die Frage, in welcher Beziehung die auffallende Bevorzugung von Ile gegenüber Leu bzw. die Vermeidung von Gly zur Thermoadaptation stehen könnte. So galt es vor allem, zu untersuchen, ob diese Unterschiede tatsächlich in Verbindung mit einer über die Kettenflexibilität beeinflussten Stabilisierung der Proteinkonformation stehen. Um die Sicherheit zu erhöhen, mit diesen Austauschen wirklich Thermophilie-spezifische Strukturmerkmale zu erfassen, wurden nur solche Positionen für die Mutagenese ausgewählt, an denen sich auch bei der P. woesei-GAPDH der Trend nach voluminöseren oder verzweigten Resten bzw. nach Gly-Vermeidungen erkennen ließ.

Durch die Beschränkung der Austausche auf Veränderungen des thermophilen Enzyms nach dem Vorbild der in der Struktur außerordentlich ähnlichen mesophilen GAPDH von M. bryantii sollten zudem Veränderungen am Molekül vermieden werden, die mit seiner Gesamtstruktur inkompatibel sind.

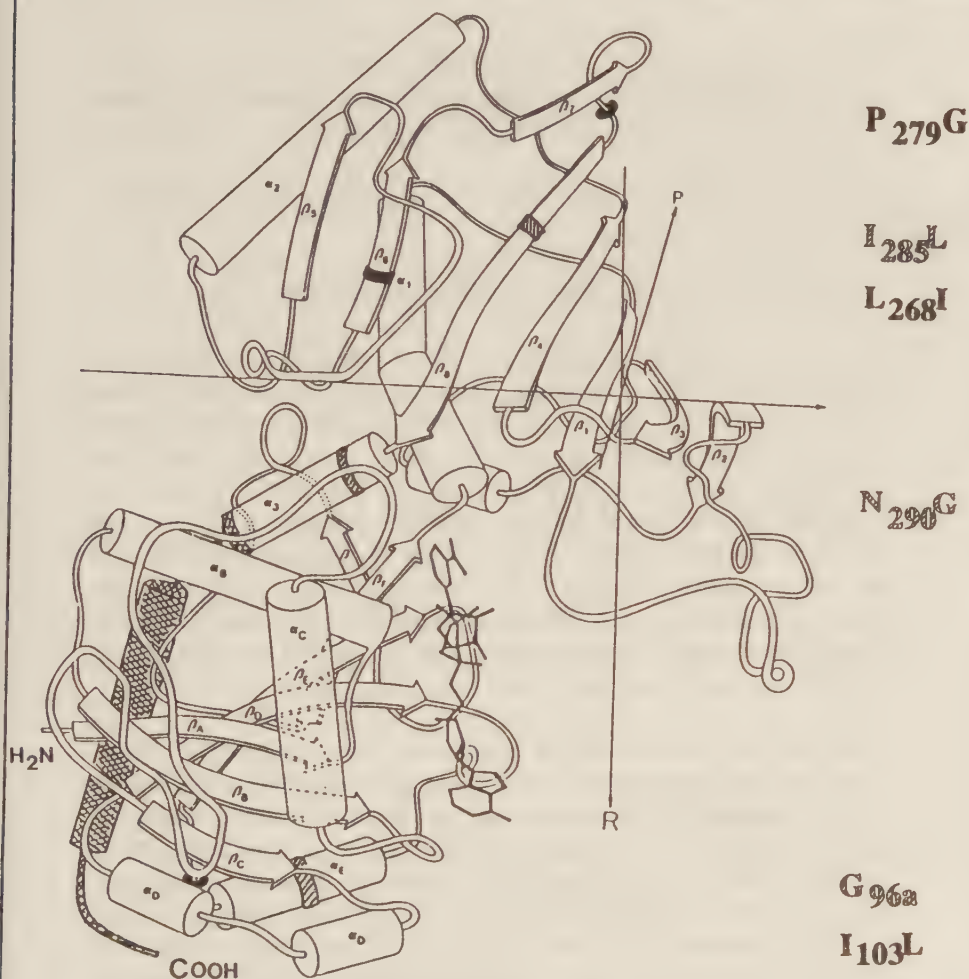


Abb. 47:

Raumstruktur-Modell zur Veranschaulichung der Lage der gezielten Mutationen in der postulierten Tertiärstruktur der *M. fervidus*-GAPDH.

Das Strukturmodell wurde von *Bacillus stearothermophilus* (Biesecker et al., 1977) übernommen. Am C-Terminus wurde der strukturellen Besonderheit der archaebakteriellen GAPDH durch Anfügen einer zusätzlichen α -Helix Rechnung getragen. Wie in Abb. 13 dargestellt, besitzen alle archaebakteriellen GAPDHs hier einen 25 Aminosäuren umfassenden, überstehenden Sequenzabschnitt; entsprechend der Sekundärstruktur-Vorhersagen nach Chou und Fasman (1978) und Garnier et al. (1978) weist dieses Fragment α -helikalen Charakter auf. Die Mutationsorte sind als schwarze oder schraffierte Markierungen eingetragen. Der doppelt schraffierte Bereich bezeichnet den Sequenzabschnitt, der in einer Hybrid-GAPDH gegen die homologe Sequenz aus *M. bryantii* ausgetauscht wurde (J. Biro, Dissertation 1989).

Die Muteine I₁₀₃L und I₂₈₅L wurden zur Überprüfung des Ile-Leu-Austausches, P₂₉₇G, N₂₉₀G und G_{96a} zur Prüfung von Gly-Eintauschen bzw. einer Gly-Insertion konstruiert. Mit dem Mutein L₂₆₈I wurde eine Referenz-Mutation einbezogen.

Einen Überblick über die Lage der Mutationen in einem Raumstrukturmodell gibt Abb. 47.

3.2.1 Einfluß der Mutationen auf die Thermostabilität

Als Maß für die Thermostabilität der verschiedenen Muteine konnte nur die Geschwindigkeit der irreversiblen Denaturierung herangezogen werden. Eine reversible Denaturierung, die die Voraussetzung für eine direkte Kalkulation der Stabilisierungsenergien wäre, ist mit den hier untersuchten GAPDH-Proteinen nicht möglich. Insofern lassen die erhaltenen Daten nur eine Aussage über den Unterschied in der Aktivierungsenergie der Denaturierung zwischen der M. fervidus-GAPDH und den Muteinen zu ($\Delta G^*_{\text{denat}} = RT \times 2,3 \log t_{0,5 E1} / t_{0,5 E2}$). Nimmt man allerdings für die in den Stabilitätsvergleich einbezogenen Proteine einen gleichen Energieinhalt im Grundzustand an, reflektiert $\Delta G^*_{\text{denat}}$ den Unterschied in der freien Energie der Stabilisierung zwischen ihnen.

Wie aus Tab. 26 zu ersehen ist, zeigen die Ile-Leu-Austausche keinen signifikanten Einfluß auf die Stabilität: I₂₈₅L verhält sich praktisch wie der Wildtyp, I₁₀₃L ist sogar etwas stabiler als dieser. Auch der Asn-Gly-Austausch ist ohne nennenswerten Effekt auf die Stabilität. Deutlicher fällt die Auswirkung der Mutation bei P₂₇₉G ins Gewicht: Aus einem Vergleich der Halbwertszeiten der Denaturierung von M. fervidus und P₂₇₉G bei 90 °C berechnet sich eine "Destabilisierungsenergie" von 0,4 kcal/mol. Dieser Wert liegt in der Größenordnung der entropischen Stabilisierung der Proteinkette, der nach Matthews et al. (1987) für den Ersatz kleiner Reste durch sperrige erwartet werden kann. Ein vergleichbarer Ala-Pro-Austausch im Lysozym erhält beispielsweise eine Stabilisierung von 0,3 kcal/mol (Matthews et al., 1987).

Tabelle 26

Stabilitätsvergleich von *M. fervidus*-GAPDH-Muteinen mit den entsprechenden Wildtyp-GAPDHs (*M. fervidus*; *M. bryantii*).

GAPDH	Intrinsische Stabilität			Stabilität in Gegenwart von 0,5 M K-Phosphat			Stabilisierung durch 0,5 M K-Phosphat (°C)
	1/T bei $t_{0,5} = 10 \text{ min}$ ($K \times 10^{-3}$)	°C bei $t_{0,5} = 10 \text{ min}$	Differenz zur <i>M. fervidus</i> -GAPDH (°C)	1/T bei $t_{0,5} = 10 \text{ min}$ ($K \times 10^{-3}$)	°C bei $t_{0,5} = 10 \text{ min}$	Differenz zur <i>M. fervidus</i> -GAPDH (°C)	
I ₁₀₃ L	2,770	88,01	+0,65	2,698	98,74	+1,89	+10,73
<i>M. fervidus</i>	2,775	87,36	0	2,706	96,55	0	+9,19
I ₂₈₅ L	2,775	87,36	0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
N ₂₉₀ G	2,779	86,84	-0,52	2,709	94,14	-0,41	+9,30
P ₂₇₉ G	2,783	86,32	-1,04	2,723	94,24	-2,31	+7,92
L ₂₆₈ I	2,786	85,93	-1,43	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
G _{96a}	2,807	83,25	-4,11	2,719	94,78	-1,77	+11,53
<i>M. bryantii</i>	2,873	75,07	-12,29	2,818	81,86	-14,69	+6,79

Noch auffallender ist die Instabilität des Referenz-Muteins L₂₆₈I. Da alle archaeobakteriellen GAPDHs an Pos. 268 (Pos.-Angabe bezogen auf die *M. fervidus*-GAPDH) Leu besitzen, ist anzunehmen, daß die sterische Situation in diesem Bereich nur eine geringe Varianz in der Wahl der Aminosäurereste zuläßt. Möglicherweise führt der Leu-Ile-Austausch, der formal dem thermophilen Trend von 37 °C nach 83 °C folgt (vgl. Tab. 23, Spalte 2) zu Störungen der internen Packung des Proteins.

Die deutlichste Wirkung auf die Thermostabilität zeigt die Gly-Insertion nach Pos. 96. Kalkuliert man, wie oben angegeben, aus den Halbwertszeiten der Denaturierung bei 90 °C die Destabilisierungsenergie, so ergibt sich zum thermophilen Wildtyp eine Differenz von 1,3 kcal/mol. Dieser Betrag erscheint etwas zu hoch, um nur mit einer erhöhten Kettenflexibilität erklärt werden zu können. Da das Sequenzalignment die Gly-Insertion in Helix α_E positioniert (Abb. 13, Abb. 47), wäre als Grund für die Destabilisierung zusätzlich eine Störung der Sekundärstruktur vorstellbar, die in der Folge die Stabilität der Gesamtkonformation des

Moleküls negativ beeinflußt.

Als weiterer Grund für die beobachtete Destabilisierung bei G_{96a} käme allerdings auch eine Störung der Interaktion benachbarter Sekundärstrukturelemente in Frage. Hinweise hierfür kommen aus Stabilitätsuntersuchungen in Gegenwart hoher Ionenstärken, die nicht nur die hier beschriebenen Muteine, sondern auch Hybrid-GAPDHs einbezogen, die durch gezielte Rekombination zwischen den gap-Genen von M. fervidus und M. bryantii konstruiert wurden (J. Biro, Dissertation 1989).

Wie bereits mehrfach erwähnt, benötigt die M. fervidus-GAPDH für ihre optimale Stabilität in vivo $0,3 \text{ M } K_3c2,3\text{-DPG}$; in vitro kann $c2,3\text{-DPG}$ durch andere Anionen (die beste Wirkung zeigt PO_4^{3-}) ersetzt werden. Während die Muteine $N_{290}G$ und $P_{279}G$ in ihrer Reaktivität gegenüber $0,5 \text{ M K-Phosphat}$ etwa dem thermophilen Wildtyp entsprechen, zeigt G_{96a} , aber auch I_{103L} , eine deutliche bessere Stabilisierung durch die hohe Ionenstärke (Tab. 26).

Auffallenderweise findet sich auch bei einer thermolabilen Hybrid-GAPDH, in der ein C-terminales Fragment von 41 Aminosäuren der M. fervidus-GAPDH durch das entsprechende Fragment der M. bryantii-GAPDH ersetzt wurde (J. Biro, Dissertation 1989; vgl. auch Abb. 47), eine überdurchschnittliche Stabilisierung durch das Salz; das quantitative Ausmaß entspricht dabei den Werten für G_{96a} und I_{103L} (J. Biro, Dissertation 1989). Diese Ähnlichkeit zwischen dem Hybrid und den beiden Muteinen deutet auf gemeinsame strukturelle Ursachen der veränderten Thermostabilität hin.

Wie im Detail bei J. Biro ausgeführt, bietet das Raumstrukturmodell für das Stabilitätsverhalten von G_{96a} , I_{103L} und der Hybrid-GAPDH eine befriedigende Erklärung. Demnach käme einer Interaktion zwischen dem C-terminalen Fragment und dem Bereich um Pos. 96 der M. fervidus-GAPDH für die konformelle Stabilität des Enzym-Moleküls große Bedeutung zu: Über diese Interaktion, die bei den eubakteriellen und eukaryontischen GAPDHs aufgrund ihres kürzeren C-Terminus auf den Kontaktbereich zwischen α_3 und β_E beschränkt ist (vgl. Biesecker et al., 1977), wird letztlich die Nukleotid-bindende Domäne und die katalytische Domäne der GAPDH "verklammert". Eine Störung dieser Interaktion - sei es durch Veränderung der C-terminalen Helix oder von β_E bzw. der vorgelagerten Struktur - müßte eine Destabilisierung der Konformation im Gesamtmolekül nach sich

ziehen. Die überdurchschnittlich hohe Wirkung der Ionenstärke auf die Thermostabilität von G_{96a} und der Hybrid-GAPDH könnte dabei als Hinweis darauf gewertet werden, daß die Instabilität dieser Mutanten auf gestörte hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführen ist.

Auch die erhöhte Stabilität des Muteins I_{103L} durch Phosphat könnte für die Beteiligung des ausgetauschten Restes an dieser Interdomänenklammer sprechen; eine Erklärung für den Effekt der Mutation kann jedoch wohl erst nach Kenntnis der detaillierten Raumstruktur der M. fervidus-GAPDH gegeben werden.

Damit können offenbar nur zwei der fünf im Hinblick auf eine Überprüfung Thermophilie-spezifischer Merkmale konstruierten Muteine (P_{279G}, G_{96a}) einen direkten Zusammenhang mit der Thermostabilität aufzeigen.

3.2.2 Einfluß der Mutationen auf die Temperaturabhängigkeit der Aktivität

Wie bereits früher dargestellt (Fabry und Hensel, 1987), ist die Temperaturabhängigkeit der Aktivität der M. fervidus-GAPDH durch Diskontinuitäten im Kurvenverlauf des Arrhenius- und Van't-Hoff-Diagramms charakterisiert (vgl. auch Abb. 29 und 30): Oberhalb von 52 °C zeigt das Enzym eine deutlich geringere Temperaturabhängigkeit von $v_{\max}$ als unterhalb dieser Grenze, während die Affinität zum Cosubstrat NAD⁺ oberhalb von 52 °C mit steigender Temperatur stärker abnimmt als im unteren Temperaturbereich. Diese Diskontinuitäten in der Temperaturabhängigkeit von $v_{\max}$ und K_m bedingen im oberen Temperaturbereich eine Dämpfung der Temperaturabhängigkeit des Quotienten k_{cat}/K_m , der die Umsatzleistung eines Enzyms unter den substratlimitierenden Bedingungen, die im allgemeinen unter in-vivo-Bedingungen vorliegen, bestimmt.

Die Temperaturkompensation des enzymatischen Umsatzes scheint eine allgemeine Eigenschaft der untersuchten archaebakteriellen GAPDHs zu sein und reflektiert wohl das grundsätzliche Bedürfnis der Zelle, auch unter variierenden Temperatureinflüssen eine balancierte Physiologie aufrechtzuerhalten. So erweist sich K_{cat}/K_m bei der GAPDH von M. bryantii über den ganzen meßbaren Temperaturbereich als weitgehend temperaturunabhängig (J. Biro, Dissertation 1989). Für die GAPDH von P. woesei wird ebenfalls eine Temperaturkompensation beobachtet; hier allerdings erst ab 62 °C (R. Hensel, pers. Mitteilung). Die unterschiedliche Höhe

der "Übergangstemperatur", ab der die Kompensation wirksam wird, hängt offensichtlich davon ab, für welchen Temperaturbereich das Enzym konstruiert wurde und spiegelt möglicherweise die Temperatur-Untergrenze des Lebensbereichs des Organismus wider.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, weisen die unterschiedlichen GAPDH-Muteine - mit gewisser Ausnahme des Referenzmuteins L_{268}^I - eine der thermophilen Wildtyp-GAPDH sehr ähnliche Temperaturabhängigkeit von $v_{\max}$ auf: $N_{290}G$, $I_{103}L$ und $P_{279}G$ besitzen im Arrhenius-Plot die gleiche Steigung und einen Knick der Kurvenführung an ähnlicher Position wie die M. fervidus-GAPDH. Allerdings haben alle Muteine über den gesamten Temperaturbereich einen erhöhten $v_{\max}$ -Wert. Die höchste spezifische Aktivität wird bei Mutein $N_{290}G$ gefunden.

Als weiteren auffälligen Unterschied zum Wildtyp - und zum Referenzmucin - zeigen $N_{290}G$, $I_{103}L$ und $P_{279}G$ deutliche Kontinuität bezüglich der Temperaturabhängigkeit von K_m ; der typische Bruch im Van't-Hoff-Diagramm liegt hier nicht mehr vor. Insbesondere diese Veränderung ist auch der Grund, daß bei den Muteinen $N_{290}G$, $I_{103}L$ und $P_{279}G$ im oberen Temperaturbereich keine Kompensation für k_{cat}/K_m auftritt, während sie bei der Referenz L_{268}^I erhalten bleibt (Abb. 31). Damit geht mit den entsprechenden Mutationen ein wesentliches Merkmal des thermophilen Wildtyps verloren.

Gerade bei Mutein $N_{290}G$, das neben $I_{103}L$ bezüglich der Thermostabilität ja am geringsten verändert ist, erscheint der Einfluß des Aminosäure-Austausches in bezug auf die Temperaturkompensation besonders auffallend. Die Wirkung des Austausches wird auf der Basis des Raumstruktur-Modells (Abb. 47) verständlich: Die Veränderung erfolgte an einer Stelle, die der Position 313 bei der B. stearothermophilus-GAPDH entspricht (Biesecker et al., 1977). Wie Abb. 47 zeigt, ist der entsprechende Aminosäurerest in B. stearothermophilus direkt an der Cosubstrat-Bindung beteiligt.

Für eine direkte Einflußnahme der in $I_{103}L$ und $P_{279}G$ ausgetauschten Aminosäurereste an der Cosubstrat-Bindung gibt es dagegen keine Hinweise. Möglicherweise wird hier die Cosubstrat-Bindung indirekt über Konformationsveränderungen beeinflusst.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung weisen somit darauf hin, daß die beiden Aspekte der molekularen Thermodaptation, Thermostabilität und Gewährleistung der biologischen Aktivität bei hohen Temperaturen, nicht unbedingt gemeinsame strukturelle Voraussetzungen haben müssen. Charakteristische Strukturunterschiede zwischen Enzymhomologen aus meso- und thermophilen Organismen dürfen also nicht ausschließlich im Hinblick auf die veränderte Thermostabilität diskutiert werden (vgl. z.B. Argos et al., 1979, Argos 1989).

Für eine biotechnologische Anwendung zeigt diese Arbeit, daß auch bei thermophilen Enzymen Freiräume bestehen, durch "protein engineering" die Umsatzeffizienz zu erhöhen, ohne die Stabilität negativ zu beeinflussen.

4. Phylogenetische Aspekte

Durch die Verwendung der Primärstrukturen von Makromolekülen wie DNS, RNS und Proteinen als "Wegweisern" auf den Spuren der Organismen-Evolution sind neue Einblicke in die phylogenetischen Zusammenhänge möglich geworden. Diese Analysen vertieften die traditionellen Vorstellungen der Entwicklungslinien von Tier- und Pflanzenwelt und ermöglichten es auch erstmals, die Verwandtschaftsbeziehungen der Prokaryonten nachzuzeichnen. Die Einbeziehung der ribosomalen RNS bei der Konstruktion phylogenetischer Stammbäume hat dabei zu der Entdeckung geführt, daß die lebende Organismenwelt nicht nur in zwei, sondern in drei monophyletische Urreiche aufgeteilt werden muß. Damit stehen zwei Prokaryontenreiche (Archaeobakterien und Eubakterien) dem Eukaryontenreich gleichberechtigt gegenüber (Woese und Fox, 1977; Woese, 1987; Leffers et al., 1987).

Es war daher naheliegend, die in dieser Arbeit beschriebenen Sequenzen der archaeobakteriellen GAPDH und PGK aus M. fervidus unter phylogenetischen Gesichtspunkten mit den Sequenzen der eubakteriellen und eukaryontischen Enzymhomologen zu vergleichen.

Auf der Basis der in Abb. 13 und Abb. 43 dargestellten Sequenzausrichtung wurden die Sequenzunterschiede zwischen den Enzymen berechnet. Die auf dieser Grundlage konstruierten Stammbäume für die GAPDH bzw. die PGK sind in Abb. 48 und 49 dargestellt.

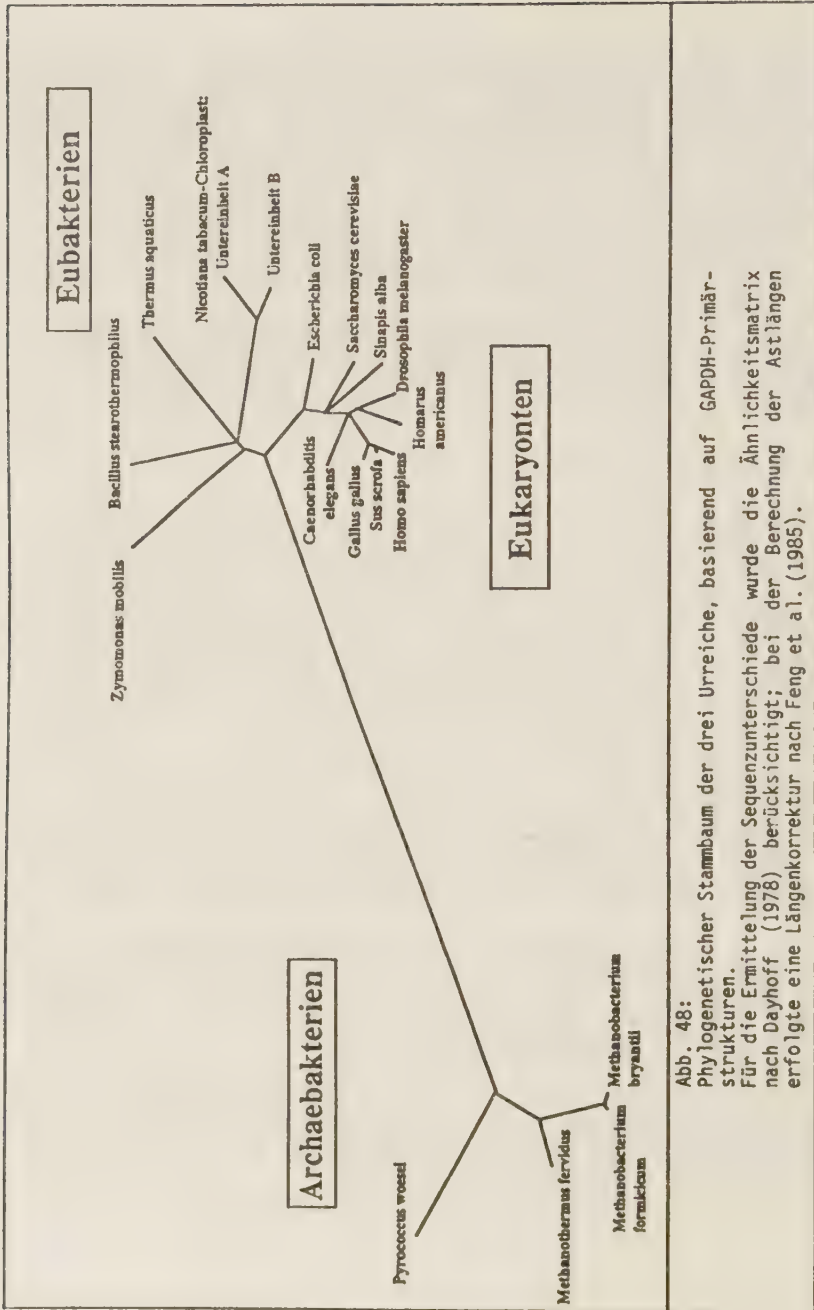


Abb. 48:
Phylogenetischer Stammbaum der drei Urreiche, basierend auf GAPDH-Primärstrukturen.
Für die Ermittlung der Sequenzunterschiede wurde die Ähnlichkeitsmatrix nach Dayhoff (1978) berücksichtigt; bei der Berechnung der Astlängen erfolgte eine Längenkorrektur nach Feng et al. (1985).

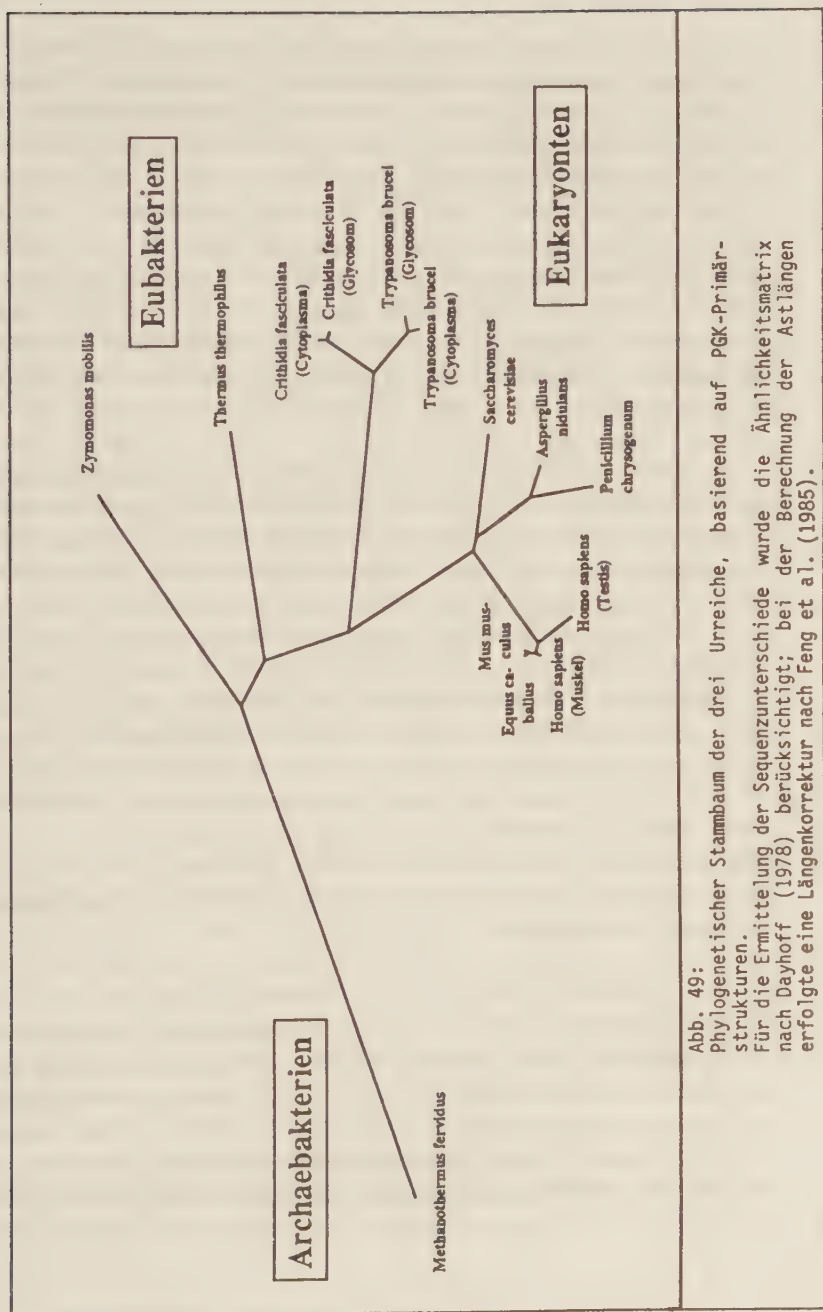


Abb. 49: Phylogenetischer Stammbaum der drei Urreiche, basierend auf PGK-Primärstrukturen. Für die Ermittlung der Sequenzunterschiede wurde die Ähnlichkeitsmatrix nach Dayhoff (1978) berücksichtigt; bei der Berechnung der Astlängen erfolgte eine Längenkorrektur nach Feng et al. (1985).

Die beiden Bäume verdeutlichen eine grundsätzlich höhere Ähnlichkeit zwischen Eubakterien und Eukaryonten als zwischen Archaeobakterien einerseits und Eubakterien und Eukaryonten andererseits. Ein entsprechendes Bild liefert auch der MDH-Stammbaum (E. Honka, Diplomarbeit 1989; Honka et al., zur Publikation eingereicht).

Eine weitere Gemeinsamkeit aller drei Stammbäume besteht darin, daß die eukaryontischen Enzymhomologen eine besondere Ähnlichkeit zu jeweils einem bestimmten eubakteriellen Vertreter besitzen. Im Falle des GAPDH-Baums weist dabei E. coli eine bevorzugte Ähnlichkeit zu den eukaryontischen Enzymhomologen auf, während bei PGK und MDH jeweils das Enzym von Thermus (T. thermophilus bzw. T. flavus) in auffälliger Nähe zu den eukaryontischen Homologen steht.

Die starke Verwandtschaft der E. coli-GAPDH zu eukaryontischen GAPDHs war auch schon früher Anlaß, nach einer Erklärung für diese spezielle Beziehung zu suchen. So wurde - wohl unter dem Eindruck der symbiontischen Lebensweise von E. coli - ein Gentransfer von einem Eukaryonten auf das Bakterium diskutiert (Martin und Cerff, 1986). Dies erscheint im Licht des in Abb. 47 gezeigten Baums unwahrscheinlich: Da unter der genannten Annahme eher eine bevorzugte Ähnlichkeit zwischen E. coli und bestimmten Vertretern der Eukaryonten (den Wirbeltieren, in denen E. coli lebt) erwartet werden würde, kann also weder die basale Position von E. coli an der Eukaryontenwurzel noch die generelle Ähnlichkeit zwischen eubakteriellen und eukaryontischen GAPDHs erklärt werden, die nach Einbeziehung der archaeobakteriellen Enzyme hervortritt.

Somit scheint die Annahme eines Gentransfers in die umgekehrte Richtung, die Übertragung des gap-Gens vom Eubakterium auf einen ursprünglichen Eukaryonten, eher berechtigt.

Dieser gap-Gen-Transfer fällt offensichtlich nicht mit dem Endosymbiosis-Ereignis zusammen, das bei den Eukaryonten zur Entstehung der Mitochondrien führte: Dafür hat die GAPDH von Zymomonas mobilis, der zur α -Gruppe der Purpurbakterien gehört, aus der die Mitochondrien hervorgegangen sein sollen (Yang et al., 1985), einen zu großen Abstand zu den Eukaryonten-GAPDHs. Zudem zeigen erste vorläufige Sequenzanalysen der GAPDH des einzelligen Eukaryonten Giardia lamblia, bei dem die Mitochondrien fehlen, typisch eubakterielle Merkmale (R. Hense, nicht

publiziert), obwohl die sehr ursprüngliche phylogenetische Position dieses Eukaryonten darauf hinweist, daß er Mitochondrien nie besessen hat (Cavalier-Smith, 1987). Diese Ähnlichkeit auch einer "primitiven" Eukaryonten-GAPDH zur eubakteriellen Gruppe läßt somit vermuten, daß der gap-Gen-Transfer schon vor der Entstehung der Mitochondrien stattgefunden hat.

Naheliegender ist es, auch die enge Beziehung zwischen den eubakteriellen und eukaryontischen PGKs und MDHs als Ergebnis eines horizontalen Gentransfers von einem Eubakterium auf die Eukaryonten zu interpretieren. Damit verstärkt sich der Eindruck, daß bezüglich der Enzyme des Primärstoffwechsels generell eine engere Beziehung zwischen Eubakterien und Eukaryonten vorliegt, als zwischen den letzteren und den Archaeobakterien.

Diesem Befund stehen allerdings Primärstrukturvergleiche anderer Makromoleküle gegenüber: So ergibt die Sequenzanalyse der DNS-abhängigen RNS-Polymerasen unter Berücksichtigung der eukaryontischen Polymerasen II und III (Pühler et al., 1989a) sowie die Analyse ribosomaler Proteine (Auer et al., 1989; Lechner et al., 1989), Elongationsfaktoren (Lechner et al., 1989) und der ATPasen (Inatomi et al., 1989) eine bevorzugte Ähnlichkeit zwischen Archaeobakterien und Eukaryonten; die Untersuchungen der 16S-rRNS (Woese, 1987) und der Genorganisation innerhalb archaeobakterieller Operons (vgl. Punkt 1.5) weisen dagegen auf eine engere phylogenetische Beziehung zwischen Archaeobakterien und Eubakterien hin.

In diesem Zusammenhang wurde kürzlich eine attraktive Hypothese vorgeschlagen, die alle scheinbar widersprüchlichen Ähnlichkeitsbeziehungen zwischen den makromolekularen Strukturen von Eukaryonten, Eubakterien und Archaeobakterien erklären könnte (Pühler et al., 1989a; Zillig et al., 1989). Demnach ist der Eukaryont ein Fusionsprodukt aus einem archaeobakteriellen und einem eubakteriellen Vorläufer; seine chimärische Natur wird durch den Besitz sowohl archaeobakteriellen als auch eubakteriellen Erbguts deutlich. Dabei spiegelt sich das archaeobakterielle Erbe in einer bevorzugten Ähnlichkeit zwischen archaeobakteriellen und eukaryontischen ATPasen, RNS-Polymerasen (speziell Polymerase II und III), ribosomalen Proteinen und Elongationsfaktoren wider, während der eubakterielle Anteil nicht nur die RNS-Polymerase I, sondern auch Enzyme des Primärstoff-

wechsels umfaßt.

Allerdings legen die entsprechenden Stammbäume der GAPDH, PGK und MDH die Vermutung nahe, daß für jedes Enzym andere Eubakterien als Gendonatoren dienten, und somit für die Anreicherung des entsprechenden eubakteriellen Erbguts im ursprünglichen Eukaryonten anstelle einer einmaligen Fusion wohl eher mehrere horizontale Gentransferereignisse anzunehmen sind.

Zusammenfassung

Die vorliegenden Untersuchungen an verschiedenen Enzymen des extrem thermophilen Archaeobakteriums Methanothermobacter fervidus (Wachstumsoptimum bei 83 °C) sollen zum Verständnis der molekularen Hintergründe beitragen, die für die Thermostabilität und Gewährleistung der von der thermophilen Zelle geforderten katalytischen Eigenschaften von Enzymen verantwortlich sind.

Als Basis für detaillierte Struktur-Funktions-Analysen an Enzymproteinen thermophiler Archaeobakterien wurden sowohl Primärstrukturaufklärungen an der D-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und 3-Phosphoglycerat-Kinase (PGK) als auch Untersuchungen zur Expression der Gene für die L-Malat-Dehydrogenase (MDH) und für die GAPDH dieses Organismus in Escherichia coli durchgeführt. Erste Versuche, die Thermophilie-spezifischen Strukturmerkmale eines archaeobakteriellen Enzyms durch gezielte Mutagenese einzugrenzen, wurden an der GAPDH von M. fervidus vorgenommen.

Sequenzvergleiche zwischen der M. fervidus-GAPDH mit den GAPDHs der mesophilen Archaeobakterien Methanobacterium bryantii und Methanobacterium formicicum sowie der GAPDH des ultrathermophilen Archaeobakteriums Pyrococcus woesei gaben folgende Hinweise auf Thermophilie-spezifische Strukturmerkmale:

- (i) In Übereinstimmung mit Befunden aus eubakteriellen und eukaryontischen Systemen ist die Anpassung an den hohen Temperaturbereich durch eine Erhöhung des Hydrophobizitätsindex und einer Reduktion der Kettenflexibilität gekennzeichnet.
- (ii) Abweichend von den bisher vorliegenden Daten spielen allerdings bei den archaeobakteriellen Enzymen Argininreste keine dominante Rolle in der strukturellen Adaptation an hohe Temperaturen.
- (iii) Die Anpassung an den jeweiligen Temperaturbereich läßt bei den archaeobakteriellen GAPDHs Unterschiede in der Wahl der Aminosäurereste erkennen: Während die Anpassung an den Temperaturbereich von 80-90 °C hauptsächlich durch eine Bevorzugung sperrigerer Reste (Isoleucin- gegenüber Leucinresten bevorzugt, Glycinreste vermieden) gekennzeichnet ist, wird die Anpassung an den ultrathermophilen Bereich (>90 °C) von einer Bevorzugung aromatischer und einer Reduktion schwefelhaltiger Reste begleitet.

Als wesentliche Voraussetzung für die experimentelle Eingrenzung Thermophilie-spezifischer Strukturmerkmale konnten Expressionssysteme für das GAPDH-Gen und das MDH-Gen von M. fervidus in E. coli etabliert werden. Da die heterolog exprimierten Proteine die gleichen Eigenschaften wie die Originale zeigen, scheint die Faltung dieser thermophilen Enzyme weitgehend insensitive gegenüber Temperatur und intrazellulärem Milieu zu sein.

Die funktionelle Bedeutung der auffallenden Sequenzunterschiede zwischen den GAPDHs des mesophilen M. bryantii bzw. M. formicicum und des extrem thermophilen M. fervidus, die in einer Bevorzugung von Isoleucin- gegenüber Leucinresten und einer Vermeidung von Glycinresten bestehen, wurden durch gezielte Eintausche typisch "mesophiler" Aminosäurereste in die Struktur der thermophilen GAPDH geprüft.

Nur zwei der fünf vorgenommenen Austausche verringerten die Thermostabilität; die restlichen führten zu einer Beeinträchtigung der für das thermophile Wildtyp-Enzym charakteristischen Temperaturkompensation von K_{cat}/K_m im Temperaturbereich über 50 °C. Damit erlauben die Austausche offensichtlich eine Differenzierung zwischen den Strukturvoraussetzungen, die die Thermostabilität bedingen, und denen, die für die Gewährleistung der von der thermophilen Zelle geforderten katalytischen Eigenschaften verantwortlich sind.

Mit den GAPDH-, PGK- und MDH-Sequenzen liegen Sequenzinformationen von drei Enzymen aus dem archaebakteriellen Primärstoffwechsel vor, die Vergleiche mit den eubakteriellen und eukaryontischen Enzymhomologen unter phylogenetischen Gesichtspunkten erlauben. Entsprechende Untersuchungen ergeben für alle drei Enzymsysteme eine bevorzugte Ähnlichkeit zwischen Eubakterien und Eukaryonten und stehen damit Befunden an DNS-abhängigen RNS-Polymerasen, ATPasen, ribosomalen Proteinen und Elongationsfaktoren gegenüber, die eine enge Beziehung zwischen Archaeobakterien und Eukaryonten fordern. Möglichkeiten zur Klärung dieser Inkonsistenz werden diskutiert.

Alphabetisches Zitateverzeichnis

- Ahern, T.J. und Klibanov, A.M.: The mechanism of irreversible enzyme inactivation at 100 °C. *Science* 228, 1280-1284 (1985)
- Ahern, T.J., Casal, J.I., Petsko, G.A. und Klibanov, A.M.: Control of oligomeric enzyme thermostability by protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 675-679 (1987)
- Almond, E.L., Clerik, A.J. und Clark, D.S.: Complementation of a thr-1 mutation of *Escherichia coli* by DNA from the extremely thermophilic archaeobacterium *Methanococcus jannaschii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30, 148-152 (1989)
- Amelunxen, R.E. und Murdock, A.L.: Mechanisms of thermophily. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 6, 343-393 (1978a)
- Amelunxen, R.E. und Murdock, A.L.: Microbial life at high temperatures: mechanisms and molecular aspects. In: *Microbial Life in Extreme Environments* (Kushner, D.J. Hrsg.) 217-278, Academic Press, London (1978b)
- Arcari, P., Martinelli, R. und Salvatore, F.: The complete sequence of a full length cDNA for human liver glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: evidence for multiple mRNA species. *Nucleic Acids Res.* 12, 9179-9198 (1984)
- Argos, P.: Sensitive procedure to compare amino acid sequences. *J. Mol. Biol.* 193, 385-396 (1987)
- Argos, P.: Engineering protein thermal stability. *J. Mol. Biol.* 206, 397-406 (1989)
- Argos, P., Rossmann, M.G., Grau, U.M., Zuber, H., Frank, G. und Tratschin, J.D.: Thermal stability and protein structure. *Biochemistry* 18, 5698-5703 (1979)
- Auer, J., Lechner, K. und Böck, A.: Gene organization and structure of two transcriptional units from *Methanococcus* coding for ribosomal proteins and elongation factors. *Can. J. Biochem.* 35, 200-204 (1989)
- Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R. und Wolfe, R.S.: Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* 43, 260-296 (1979)
- Banks, R.D., Blake, C.C., Evans, P.R., Haser, R., Rice, D.W., Hardy, G.W., Merrett, M. und Phillips, A.W.: Sequence, structure and activity of phosphoglycerate kinase: A possible hinge-bending enzyme. *Nature* 279, 773-777 (1979)
- Baxter-Gabbard, K.L.: A simple method for the large-scale preparation of sucrose gradients. *FEBS Lett.* 20, 117-119 (1972)
- Bergthöfer, B., Kröckel, L., Körtner, C., Truss, M., Schallenberg, J. und Klein, A.: Relatedness of archaeobacterial RNA polymerase core subunits to their eubacterial and eukaryotic equivalents. *Nucleic Acids Res.* 16, 8113-8128 (1988)
- Bergquist, P.L., Love, D.R., Croft, J.E., Streiff, M.B., Daniel, R.M. und Morgan, W.H.: Genetics and potential biotechnological applications of thermophilic and extremely thermophilic microorganisms. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 5, 199-244 (1987)
- Bernstein, F.C., Koetzle, T.F., Williams, G.J., Meyer, E.F., Brice, M.D., Rodgers, J.R., Kennard, O., Shimanouchi, T. und Tasumi, M.: The protein data bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* 112, 535-542 (1977)
- Biesecker, G., Harris, J., Thierry, J.C., Walker, J.E. und Wonacott, A.J.: Sequence and structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *Nature* 266, 328-333 (1977)
- Birktoft, J.J., Fernley, R.T., Bradshaw, R.A. und Banaszak, L.J.: Amino acid sequence homology among 2-hydroxy acid dehydrogenases: mitochondrial and cytoplasmic maleate dehydrogenases form a homologous system with lactate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6166-6170 (1982)
- Biro, J.: Struktur-Funktions-Untersuchungen an Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenasen mesophiler Methanbakterien. Dissertation, Fakultät Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (in Vorbereitung)
- Bokranz, M. und Klein, A.: Nucleotide sequence of the Methyl coenzyme M reductase gene cluster from *Methanosarcina barkeri*. *Nucleic Acids Res.* 15, 4350-4351 (1987)
- Bokranz, M., Bäumner, G., Allwansberger, R., Ankel-Fuchs, D. und Klein, A.: Cloning and characterization of the Methyl coenzyme M reductase genes from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Bacteriol.* 170, 568-577 (1988)
- Bollschweiler, C., Kühn, R. und Klein, A.: Non-repetitive AT-rich sequences are found in intergenic regions of *Methanococcus voltae* DNA. *The EMBO Journal* 4, 805-809 (1985)

- Branlant, C., Oster, Y. und Branlant, G.: Nucleotide sequence determination of the DNA region coding for *Bacillus stearothermophilus* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and of the flanking DNA regions required for its expression in *Escherichia coli*. *Gene* 75, 145-155 (1989)
- Branlant, G. und Branlant, C.: Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* gap gene. Different evolutionary behaviour of the NAD⁺-Binding domain and of the catalytic domain of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 150, 61-66 (1985)
- Brinkmann, H., Martinez, P., Quigley, F., Martin, W. und Cerff, R.: Endosymbiotic origin and codon bias of the nuclear gene for chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from maize. *J. Mol. Evol.* 26, 320-328 (1987)
- Brosius, J. und Holy, A.: Regulation of ribosomal RNA promoters with a synthetic lac operator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6929-6933 (1984)
- Brown, J.W., Daniels, C.J. und Reeve, J.N.: Gene structure, organization, and expression in archaeobacteria. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 16, 287-338 (1989)
- Böhner, M., Ford, G.C., Moras, D., Olsen, K.W. und Rossmann, M.G.: Three-dimensional structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 90, 25-40 (1974)
- Cavalier-Smith, T.: Eukaryotes without mitochondria. *Nature* 326, 332-333 (1987)
- Chou, P.Y. und Fasman, G.D.: Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol.* 47, 54-148 (1978)
- Clements, J.M. und Roberts, C.F.: Transcription and processing signals in the 3-phosphoglycerate kinase (PGK) gene from *Aspergillus nidulans*. *Gene* 44, 97-105 (1986)
- Clewell, D.B. und Helinski, D.R.: Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli*: Purification and induced conversion to an open circular DNA form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62, 1159-1166 (1969)
- Conway, T., Sewell, G.W. und Ingram, L.O.: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Zymomonas mobilis*: Cloning, sequencing, and identification of promoter region. *J. Bacteriol.* 169, 5653-5662 (1987)
- Conway, T. und Ingram, L.O.: Phosphoglycerate kinase gene from *Zymomonas mobilis*: Cloning, sequencing and localization within the *gap* operon. *J. Bacteriol.* 170, 1926-1935 (1988)
- Cram, D.S., Sherf, B.A., Libby, R.T., Mattaliano, R.J., Ramchandran, K.L. und Reeve, J.N.: Structure and expression of the genes *mcrB* and *mcrA*, which encode the subunits of component C of Methyl coenzyme M reductase in *Methanococcus vannielii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3992-3996 (1987)
- Cue, D., Beckler, G.S., Reeve, J.N. und Konisky, J.: Structure and sequence divergence of two archaeobacterial genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4207-4211 (1985)
- Culham, D.E. und Nazar, R.N.: Multiple termination sites in an unlinked 5S rRNA operon in the archaeobacterium, *Thermococcus celer*. *Mol. Gen. Genet.* 216, 412-416 (1989)
- Curry, K.A. und Tomich, C.-S.C.: Effect of ribosome binding site on gene expression in *Escherichia coli*. *DNA* 7, 173-179 (1988)
- Daiböge, H., Sören, C., Jensen, E.B., Christensen, T. und Dahl, H.-H.: Expression of recombinant growth hormone in *Escherichia coli*: Effect of the region between the Shine Dalgarno sequence and the ATG initiation codon. *DNA* 7, 399-405 (1988)
- Davidson, B.E., Sajgo, M., Moller, H.F. und Harris, J.I.: Amino acid sequence of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from lobster muscle. *Nature* 216, 1181-1185 (1967)
- Dayhoff, M.O.: A model of evolutionary changes in proteins. Matrices for detecting distant relationships. In: *Atlas of Protein Sequence and Structure* 5 (Dayhoff, M.O. Hrsg.), 345-358, Natl. Biochem. Res. Foundation, Washington, D.C. (1978)
- Dugalczyk, A., Haron, J.A., Stone, E.M., Dennison, O.E., Rothblum, K.M. und Schwartz, R.J.: Cloning and sequencing of a deoxyribonucleic acid copy of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase messenger ribonucleic acid isolated from chicken muscle. *Biochemistry* 22, 1605-1613 (1983)
- Dunn, R.J., Hackett, M.R., McCoy, J.M., Chao, B.H., Kimura, K. und Khorana, H.G.: Structure-Function studies on Bacteriorhodopsin. I. Expression of the bacterio-opsin gene in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262, 9246-9254 (1987)
- Eisenberg, D., Weiss, R.M. und Terwilliger, T.C.: The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 140-144, (1984)

- Ernst, J.: Codon usage and gene expression. *Trends in Biotechnology* 6, 196-199 (1988)
- Fabry, S.: Isolierung und Charakterisierung der Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase aus dem thermophilen Archaeobakterium *Methanothermobacter fervidus*. Diplomarbeit, Fakultät Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (1986)
- Fabry, S. und Hensel, R.: Purification and characterization of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the thermophilic archaeobacterium *Methanothermobacter fervidus*. *Eur. J. Biochem.* 165, 147-155 (1987)
- Feng, D.F., Johnson, M.S. und Doolittle, R.F.: Aligning amino acid sequences: comparison of commonly used methods. *J. Mol. Evol.* 21, 112-125 (1985)
- Fitch, W.M. und Margoliash, E.: Construction of phylogenetic trees. *Science* 15, 279-284 (1967)
- Florkiewicz, R.Z. und Sommer, A.: Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3978-3981 (1989)
- Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., El Sabrouly, S., Dani, C., Jeanteur, P. und Blanchard, J.M.: Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase multigene family. *Nucleic Acids Res.* 13, 1431-1442 (1985)
- Fritz, H.-J., Hohlmaier, J., Kramer, W., Ohmayer, A. und Wippler, J.: Oligonucleotide-directed construction of mutants: a Gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro. *Nucl. Acid Res.* 16, 6987-6999 (1988)
- Fürste, J.P., Pansegrau, W., Frank, R., Blöcker, H., Scholz, P., Bagdasarian, M. und Lanka, E.: Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range tacP expression vector. *Gene* 48, 119-131 (1986)
- Garnier, J., Osguthorpe, D.J. und Robson, B.: Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* 120, 97-120 (1978)
- Gribskov, M., McLachlan, A.D. und Eisenberg, D.: Profile analysis: detection of distantly related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4355-4358 (1987)
- Gruetter, M.G., Hawkes, R.B. und Matthews, B.W.: Molecular basis of thermostability in the lysozyme from bacteriophage T4. *Nature* 277, 667-669 (1979)
- Guo, L.-H., Yang, R.C.A. und Wu, R.: An improved strategy for rapid sequencing of both strands of long DNA molecules cloned in a plasmid. *Nucl. Acids Res.* 11, 5521-5539 (1983)
- Gupta, K.C. und Patwardhan, S.: ACG, the initiator codon for a sendai virus protein. *J. Biol. Chem.* 263, 8553-8556 (1988)
- Haas, E.S., Daniels, C.D. und Reeve, J.M.: Genes encoding 5S rRNA and tRNA in the extremely thermophilic archaeobacterium *Methanothermobacter fervidus*. *Gene* 77, 253-263 (1989)
- Hamilton, P.T. und Reeve, J.N.: Structure of genes and insertion element in the methane producing archaeobacterium *Methanobrevibacter smithii*. *Mol. Gen. Genet.* 200, 47-59 (1985a)
- Hamilton, P.T. und Reeve, J.N.: Sequence divergence of an archaeobacterial gene cloned from a mesophilic and a thermophilic methanogen. *J. Mol. Evol.* 22, 351-360 (1985b)
- Harris, J.I. und Perham, R.N.: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from pig muscle. *Nature* 219, 1025-1028 (1968)
- Hecht, M., Sturtevant, J.M. und Sauer, R.T.: Effect of single amino acid replacements on the thermal stability of the NH₂-terminal domain of phage λ repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5685-5689 (1984)
- Heinrich, P.: Guidelines for quick and simple plasmid sequencing. Boehringer Monograph, Mannheim (1986)
- Hensel, R., Laumann, S., Lang, J., Heumann, H. und Lottspeich, F.: Characterization of two D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from the extremely thermophilic archaeobacterium *Thermoproteus tenax*. *Eur. J. Biochem.* 170, 325-333 (1987)
- Hensel, R. und König, H.: Thermoadaptation of methanogenic bacteria by intracellular ion concentration. *FEMS Microbiol. Letters* 49, 75-79 (1988)
- Herbert, R.A. und Codd, G.A. (Hrsg.): *Microbes in extreme environments*. Academic Press, London (1986)
- Hitzeman, R.A., Hagie, F.E., Hayflick, J.S., Chen, C.Y., Seeburg, P.H. und Derynck, R.: The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for 3-phosphoglycerate kinase. *Nucleic Acids Res.* 10, 7791-7808 (1982)
- Hocking, J.D. und Harris, J.I.: D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Amino acid sequence of the enzyme from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Eur. J. Biochem.* 108, 567-579 (1980)

- Hofschneider, P.H.: Untersuchungen über "kleine" *E. coli* K 12 Bakteriophagen. Z. Naturforschung 18 b, 203-210 (1963)
- Holland, J.P. und Holland, M.J.: The primary structure of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 254, 9839-9845 (1979)
- Holland, J.P. und Holland, M.J.: Structural comparison of two non tandemly repeated yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. J. Biol. Chem. 255, 2596-2605 (1980)
- Holland, J.P., Labienic, L., Swimmer, C. und Holland, M.J.: Homologous nucleotide sequences at the 5' termini of messenger RNAs synthesized from the yeast enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene families. J. Biol. Chem. 258, 5291-5299 (1983)
- Honka, E.: Charakterisierung der Malatdehydrogenase des extrem thermophilen Archaeobakteriums *Methanothermus fervidus* und Sequenzierung des codierenden Gens. Diplomarbeit, Fakultät Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (1989)
- Honka, E., Fabry, S., Niermann, T., Palm, P. und Hensel, R.: Properties and primary structure of the L-malate dehydrogenase from the extremely thermophilic archaeobacterium *Methanothermus fervidus*. Eingereicht zur Publikation bei J. Biol. Chem.
- Imura, T., Utatsu, I. und Toh-E, A.: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes of *Zygosaccharomyces rouxii*: The source of a promoter for a host-vector system for *Z. rouxii*. Agric. Biol. Chem. 51, 1641-1647 (1987)
- Inatomi, K.-I., Eya, S., Maede, M. und Futai, M.: Amino acid sequence of the α and β subunits of *Methanosarcina barkeri* ATPase deduced from cloned genes. J. Biol. Chem. 264, 10954-10959 (1989)
- Ish-Horowitz, D. und Burke, J.F.: Rapid and efficient cosmid cloning. Nucl. Acids Res. 9, 2989-2998 (1981)
- Jessee, J.: New subcloning efficiency - Competent cells: $>1 \times 10^6$ Transformants/ μ g. FOCUS 8 No. 4, 9-10, Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg (1986)
- Joyce, G.: Hydrothermal vents too hot? Nature 334, 564 (1988)
- Karnik, S.S., Nassal, M., Doi, T., Jay, E., Sgarrella, V. und Khorana, H.G.: Structure-function studies on bacteriorhodopsin. II. Improved expression of the bacterio-opsin gene in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 262, 9255-9263 (1987)
- Karplus, P.A. und Schulz, G.E.: Prediction of chain flexibility in proteins. Naturwissenschaften 72, 212-215 (1985)
- Kelly, R.M. und Deming, J.W.: Extremely thermophilic archaeobacteria: biological and engineering considerations. Biotechnology Progress 4, 47-62 (1988)
- Khudyakov, Y.E., Nepiyueva, V.S., Kalinina T.I. und Smirnov, V.D.: Effect of the structure of the initiator codon on translation in *E. coli*. FEBS Lett. 232, 369-371 (1988)
- Kozak, M.: Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eukaryotes, and organelles. Microbiol. Reviews 47, 1-45 (1983)
- Kramer, W., Drutsa, V., Jansen, H.-W., Kramer, B., Pflugfelder, M. und Fritz, H.-J.: The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide directed mutation construction. Nucl. Acids Res. 12, 9441-9456 (1984)
- Kramer, W. und Fritz, H.-J.: Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA. Methods in Enzymology 154 (Mu, R. und Grossman, L. Hrsg.), 350-367, Academic Press, New York (1987)
- Kyte, J. und Doolittle, R.F.: A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein. J. Mol. Biol. 157, 105-132 (1982)
- Lang, J.: Vergleichende Untersuchungen an Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenasen verschiedener meso- und thermophiler Archaeobakterien. Diplomarbeit, Fakultät Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (1986)
- Lechner, K., Heller, G. und Böck, A.: Organization and nucleotide sequence of a transcriptional unit of *Methanococcus vannielii* comprising genes for protein synthesis, elongation factors, and ribosomal proteins. J. Mol. Evol. 29, 20-27 (1989)
- Leffers, H., Gropp, F., Lottspeich, F., Zillig, W. und Garret, R.A.: Sequence, organization, transcription and evolution of RNA polymerase subunit genes from the archaeobacterial extreme halophiles *Halobacterium halobium* and *Halococcus morrhuae*. J. Mol. Biol. 206, 1-17 (1989)
- Leffers, H., Kjems, J., Østergaard, L., Larsen, N. und Garret, R.A.: Evolutionary relationships amongst archaeobacteria. A comparative study of 23 S ribosomal RNAs of a sulphur-dependent extreme thermophile, an extreme halophile and a thermophilic methanogen. J. Mol. Biol. 195, 43-61 (1987)

- Levin, Ö.: Column chromatography of Proteins: Calcium phosphate. *Methods in Enzymology* 5 (Colowick, S.P. und Kaplan, N.O. Hrsg.) 27-32, Academic Press, New York (1962)
- Ljungdahl, L.G.: Physiology of thermophilic bacteria. In: *Advances in Microbial Physiology* (Rose, A.H. und Morris, J.G., Hrsg.) 149-243, Academic Press, London (1979)
- Makino, Y., Negoro, S., Urabe, J. und Okada, H.: Stability-increasing mutants of glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium* IWG3. *J. Biol. Chem.* 264, 6381-6385 (1989)
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982)
- Mann, K. und Mecke, D.: Inhibition of spinach glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases by pentalenolactone. *Nature* 282, 535-536, (1979)
- Marmur, J.: A procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.* 3, 208-218 (1961)
- Martin, W. und Cerff, R.: Prokaryotic features of a nucleus-encoded enzyme, cDNA sequences for chloroplast and cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from mustard (*Sinapis alba*). *Eur. J. Biochem.* 159, 323-331 (1986)
- Matthews, B.W.: Genetic and structural analysis of the protein stability problem. *Biochemistry* 26, 6865-6868 (1987)
- Matthews, B.W., Nicholson, H. und Becktel, W.J.: Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6663-6667 (1987)
- McCarrey, J.R. und Thomas, K.: Human testis specific PGK gene lacks introns and possesses characteristics of a processed gene. *Nature* 326, 501-504 (1987)
- Merkler, D.J., Farrington, G.K. und Wedler, F.C.: Protein thermostability. *Int. J. Peptide Protein Res.* 18, 430-442 (1981)
- Merrett, M.: Primary structure of 3-phosphoglycerate kinase from horse muscle. *J. Biol. Chem.* 256, 10293-10305 (1981)
- Messing, J.: A multipurpose cloning system based on the single stranded DNA bacteriophage M13. *Recombinant DNS Technical Bulletin*, NIH Publication No. 79-99, No. 2, 43-80 (1979)
- Michelson, A.M., Markham, A.F. und Orkin, S.H.: Isolation and DNA sequence of a full-length cDNA clone for human X chromosome-encoded phosphoglycerate kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 472-476 (1983)
- Moore, R.L. und McCarthy, B.J.: Base sequence homology and renaturation studies of the deoxyribonucleic acid of extremely halophilic bacteria. *J. Bacteriol.* 99, 255-262 (1969)
- Mori, N., Singer-Sam, J., Lee, C.Y. und Riggs, A.D.: The nucleotide sequence of a cDNA clone containing the entire coding region for mouse X chromosome-linked phosphoglycerate kinase. *Gene* 45, 275-280 (1986)
- Nassal, M., Mogi, T., Karnik, S.S. und Khorana, H.G.: Structure-function studies on bacteriorhodopsin. III. Total synthesis of a gene for bacterio-opsin and its expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262, 9264-9270 (1987)
- Needleman, S.B. und Wunsch, C.D.: A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* 48, 443-453 (1970)
- Ng, T.K. und Kenealy, W.R.: Industrial applications of thermostable enzymes. In: *Thermophiles* (Brock, W.A., Hrsg.) 197-215, Wiley & Sons, New York (1986)
- Nicholls, R.D.: Direct cloning in plasmid libraries after fragment enrichment. *Focus* 8 No. 2, 1-3, Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg (1986)
- Nobuhara, M., Morishita, H., Tohyama, J., Ogino, H., Nii, A., Nagase, Y. und Kanamori, T.: Increased expression in *Escherichia coli* of human tumor necrosis factor through in vitro mutagenesis around the initiation codon. *Agric. Biol. Chem.* 52, 1331-1338 (1988)
- Norrander, J., Kempe, T. und Messing, J.: Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide directed mutagenesis. *Gene* 26, 101-106 (1983)
- Nowak, K., Wolny, M. und Banas, T.: The complete amino acid sequence of human muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *FEBS Lett.* 134, 143-146 (1981)
- Osinga, K.A., Swinkels, B.W., Gibson, W.C., Borst, P., Veeneman, G.H., Van Boom, J.H., Michels, P.A. und Opperdoes, F.R.: Topogenesis of microbody enzymes: A Sequence comparison of the genes for the glycosomal (microbody) and cytosolic phosphoglycerate kinases of *Trypanosoma brucei*. *The EMBO Journal* 4, 3811-3817 (1985)

- Paupit, R.A., Karlsson, R., Picot, D., Jenkins, J.A., Niklaus-Reimer, A.-S. und Jansonius, J.N.: Crystal structure of neutral protease from *Bacillus cereus* refined at 3.0 Å resolution and comparison with the homologous but more stable enzyme thermolysin. *J. Mol. Biol.* 199, 525-537 (1988)
- Peabody, D.S.: Translation initiation at non-ATG triplets in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 264, 5031-5035 (1989)
- Perutz, M.F. und Raidt, H.: Stereochemical basis of heat stability in bacterial ferredoxins and in hemoglobin A2. *Nature* 255, 256-259 (1975)
- Prats, A.-C., Billy, G., Wang, P. und Darlix, J.-L.: CUG initiation codon used for the synthesis of a cell surface antigen coded by the murine leukemia virus. *J. Mol. Biol.* 205, 363-372 (1989)
- Pühler, G., Leffers, H., Gropp, F., Palm, P., Klenk, H.-P., Lottspeich, F., Garrett, R.A. und Zillig, W.: Archaeobacterial DNA-dependent RNA polymerase testify to the evolution of the eukaryotic nuclear genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4569-4573 (1989a)
- Pühler, G., Lottspeich, F. und Zillig, W.: Organization and nucleotide sequence of the genes encoding the large subunits A, B, and C of the DNA-dependent RNA polymerase of the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Nucleic Acids Res.* 17, 4517-4534 (1989b)
- Punt, P.J., Dingemans, M.A., Jacobs-Meijns, B.J., Pouwels, P.H. und van den Hondel, C.A.: Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Aspergillus nidulans*. *Gene* 69, 49-57 (1988)
- Reddy, P., Peterkofsky, A. und McKenny, K.: Translational efficiency of the *Escherichia coli* adenylate cyclase gene: Mutating the UUG initiation codon to GUG or AUG results in increased gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5656-5660 (1985)
- Reeve, J.N., Hamilton, P.T., Beckler, G.S., Morris, C.J. und Clarke, C.H.: Structure of methanogen genes. *Syst. Appl. Microbiol.* 7, 5-12 (1986)
- Reiter, W.-D., Palm, P. und Zillig, W.: Transcription termination in the archaeobacterium *Sulfolobus*: Signal structures and linkage to transcription initiation. *Nucleic Acids Res.* 16, 2445-2459 (1988)
- Riley, M. und Anilionis, A.: Evolution of the bacterial genome. In: *Annual Review of Microbiology* 32 (Starr, M.P. Hrsg.), 519-560, Annual Reviews Inc., Palo Alto, Kalifornien (1978)
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. und Arnheim, N.: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354 (1985)
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable polymerase. *Science* 239, 487-491 (1988)
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467 (1977)
- Shuber, A.P., Orr, E.C., Rechy, M.A., Schendel, P.F., May, H.D., Schauer, N.L. und Ferry, J.G.: Cloning, expression, and nucleotide sequence of the formate dehydrogenase genes from *Methanobacterium formicicum*. *J. Biol. Chem.* 261, 12942-12947 (1986)
- Shepherd, J.C.: Method to determine the reading frame of a protein from the purine/pyrimidine genome sequence and its possible evolutionary justification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1596-1600 (1981)
- Shih, M.-C., Lazar, G. und Goodman, H.M.: Evidence in favor of the symbiotic origin of chloroplasts: Primary structure and evolution of tobacco glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *Cell* 47, 73-80 (1986)
- Shortle, D.: Probing the determinants of protein folding and stability with amino acid substitutions. *J. Biol. Chem.* 264, 5315-5318 (1989)
- Sibold, L. und Henriquet, M.: Cloning the trp genes from the archaeobacterium *Methanococcus voltae*: Nucleotide sequence of the trpBA genes. *Mol. Gen. genet.* 214, 439-450 (1988)
- Sidler, W., Niederer, E., Suter, F. und Zuber, H.: The primary structure of *Bacillus cereus* neutral protease and comparison with thermolysin and *Bacillus subtilis* neutral protease. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 367, 643-657 (1986)
- Skarzynski, T., Moody, P.C. und Wonnacott, A.J.: Structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 193, 171-187 (1987)
- Sørensen, M.A., Kurland, C.G. und Pedersen, S.: Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 207, 365-377 (1989)

- van Solingen, P., Muurling, H., Koeckman, B. and van den Berg, J.: Sequence of the Penicillium chrysogenum phosphoglycerate kinase. Nucleic Acids Res. 16, 11823 (1988)
- Souillard, M., Magot, M., Possot, O. and Sibold, L.: Nucleotide sequence of region homologous to nif H (nitrogenase Fe protein) from the nitrogen-fixing archaeobacteria Methanococcus thermolithotrophicus and Methanobacterium ivanovii: Evolutionary implications. J. Mol. Evol. 27, 65-76 (1988)
- Southern, E.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975)
- Stetter, K.O., Thoma, M., Winter, J., Wildgruber, G., Huber, H., Zillig, W., Janekovic, D., König, H., Palm, P. and Wunderl, S.: Methanothermus fervidus sp. nov., a novel extremely thermophilic methanogen isolated from an Icelandic hot spring. Zbl. Bacteriol. Hyg. I Abt. Orig. C 2, 166-178 (1981)
- Stetter, K.O., König, H. and Stackebrandt, E.: Pyrodicticum gen. nov., a new genus of submarine disc-shaped sulphur reducing archaeobacteria growing optimally at 105 °C. Syst. Appl. Microbiol. 4, 535-551 (1983)
- Swinkels, B.W., Evers, R. and Borst, P.: The topogenic signal of the glycosomal (microbody) phosphoglycerate kinase of Crithidia fasciculata resides in a carboxy-terminal extension. The EMBO Journal 7, 1159-1165 (1988)
- Tanford, C.: Contribution of hydrophobic interactions to the stability of the globular conformation of proteins. J. Americ. Chem. Soc. 84, 4240-4247 (1962)
- Tomazic, S.J. and Klivanov, A.M.: Mechanisms of irreversible thermal inactivation of Bacillus α -amylases. J. Biol. Chem. 263, 3086-3091 (1988a)
- Tomazic, S.J. and Klivanov, A.M.: Why is one Bacillus α -amylase more resistant against irreversible thermoinactivation than another? J. Biol. Chem. 263, 3092-3096 (1988b)
- Tomich, C.-S.C., Olson, R. and Kaytes, P.S., Rockenbach, S.K. and Hatzenbuehler, M.T.: Effect of nucleotide sequences directly downstream from the AUG on the expression of bovine somatotropin in E. coli. Nucleic Acids Res. 17, 3179-3197 (1989)
- Trifonov, E.N.: Translation framing code and frame-monitoring mechanism as suggested by the analysis of mRNA and 16S rRNA nucleotide sequences. J. Mol. Biol. 194, 643-652 (1987)
- Tso, J.Y., Sunn, X.-H. and Wu, R.: Structure of two unlinked Drosophila melanogaster glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. J. Biol. Chem. 260, 8220-8228 (1985)
- Viaene, A. and Dhaese, P.: Sequence of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from Bacillus subtilis. Nucleic Acids Res. 17, 1251 (1989)
- Vieira, J. and Messing, J.: Production of single-stranded plasmid DNA. Methods in Enzymology 153 (Wu, R. and Grossman, L. Hrsg.) 3-11 (1987)
- Vihinen, M.: Relationship of protein flexibility to thermostability. Protein Engineering 1, 477-480 (1987)
- Walker, J.E., Wonacott, A.J. and Harris, J.I.: Heat stability of a tetrameric enzyme, D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Eur. J. Biochem. 108, 581-586 (1980)
- Ward, O.P. and Moo-Young, M.: Thermostable enzymes. Biotech. Advances 6, 39-69 (1988)
- Watson, H.C., Walker, M.P., Shaw, P.J., Bryant, T.N., Wendell, P.L., Fothergill, L.A., Perkins, R.E., Conroy, S.C., Dobson, M.J., Tuite, M.F., Kingsman, A.J. and Kingsman, S.M.: Sequence and structure of yeast phosphoglycerate kinase. The EMBO Journal 1, 1635-1640 (1982)
- Weil, C.F., Beckler, G.S. and Reeve, J.N.: Structure and organization of the hlsA gene of the thermophilic archaeobacterium Methanococcus thermolithotrophicus. J. Bacteriol. 169, 4857-4860 (1987)
- Weil, C.F., Cram, D.S., Sherf, B.A. and Reeve, J.N.: Structure and comparative analysis of the genes encoding component C of methyl coenzyme M reductase in the extremely thermophilic archaeobacterium Methanothermus fervidus. J. Bacteriol. 170, 4718-4726 (1988)
- Weyens, G., Charlier, D., Roovers, M., Pierard, A. and Glandsdorff, N.: On the role of the Shine-Dalgarno sequence in determining the efficiency of translation initiation at a weak start codon in the car operon of Escherichia coli. J. Mol. Biol. 204, 1045-1048 (1988)
- Woese, C.R.: Bacterial evolution. Microbiological Reviews 51, 221-271 (1987)
- Woese, C.R. and Fox, G.F.: Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5088-5090 (1977)

- Hood, A.G., Redborg, A.H., Cue, D.R., Whitman, W.B. und Konisky, J.: Complementation of *argC* and *hisA* mutations of *Escherichia coli* by DNA cloned from the archaeobacterium *Methanococcus voltae*. J. Bacteriol. 156, 19-29 (1983)
- Hoods, D.: Oligonucleotide screening of cDNA libraries. FOCUS 6 No. 3, 1-2, Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg (1984)
- Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G.J. und Moese, C.R.: Mitochondrial origins. Proc. Natl. Acad. Sci USA 82, 4443-4447 (1985)
- Yarbrough, P.O., Hayden, M.A., Dunn, L.A., Vermesch, P.S., Klass, M.R. und Hecht, R.M.: The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family in the nematode, *Caenorhabditis elegans*; Isolation and characterization of one of the genes. Biochim. Biophys. Acta 908, 21-33 (1987)
- Yutani, K., Ogasahara, K., Suzuki, M. und Sugino, Y.: Effect of a single amino acid substitution on conformational stability of the tryptophan synthase α -subunit of *Escherichia coli*. In: Biochemistry of Thermophily (Friedman, M.F. Hrsg.) 233-249, Springer, Heidelberg (1976)
- Zale, S.E. und Klibanov, A.M.: Why does ribonuclease irreversibly inactivate at high temperatures? Biochemistry 25, 5432-5444 (1986)
- Zillig, W., Palm, P., Reiter, W.-D., Gropp, F., Pühler, G. und Klenk, H.-P.: Comparative evaluation of gene expression in archaeobacteria. Eur. J. Biochem. 173, 473-482 (1988)
- Zillig, W., Klenk, H.-P., Palm, P., Leffers, H., Pühler, G., Gropp, F. und Garrett, R.A.: Did eukaryotes originate by a fusion event? Endocyt. Cell. Res., in press.
- Zuber, H.: Comparative studies of thermophilic and mesophilic enzymes: objectives, problems, results. In: Biochemistry of Thermophily (Friedman, S.M. Hrsg.) 267-285 Academic Press, London (1978)
- Zuber, H.: Structure and function of thermophilic enzymes. In: Structural and Functional Aspects of Enzyme Catalysis (Eggerer, H. und Huber, R. Hrsg.) 114-127, Springer, Heidelberg (1981)
- Zuber, H.: Temperature adaptation of lactate dehydrogenase: Structural, functional and genetic aspects. Biophys. Chem. 29, 171-179 (1988)
- Zwinkl, P.: Klonierung und Sequenzierung des Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Gens aus dem ultrathermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus woesei*. Diplomarbeit, Fakultät Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (1989)

Alphabetisches Verzeichnis allgemeiner Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Anh.	Anhang
atm	Atmosphäre(n)
b	Base(n)
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
CoM	Coenzym M
c2,3-DPG	cyclisches 2,3-Diphosphoglycerat
dest.	destilliert
DHase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
1,3-DPG	1,3-Diphosphoglycerat
2,3-DPG	2,3-Diphosphoglycerat
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
E ₂₆₀	Extinktion bei 260 Nanometern Wellenlänge
g	Gramm
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GAPDH(s)	D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase(n)
gap-Gen	D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gen
h	Stunde(n)
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
K-	Kalium-
kb	Kilobasen
kcal	Kilokalorien
k _{cat}	katalytische Konstante
K _m	Michaelis-Konstante
K ₂ c2,3-DPG	Kalium-Salz des cyclischen 2,3-Diphosphoglycerats
L-LDH(s)	L-Laktat-Dehydrogenase(n)
M	Mol
MCS(s)	Multiple Cloning Site(s)
MDH(s)	L-Malat-Dehydrogenase(n)
mdh-Gen	L-Malat-Dehydrogenase-Gen
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
MPI	Max-Planck-Institut
mRNS	Messenger-Ribonukleinsäure
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromol
μ Cl	Mikrocurie
Na-	Natrium-
NAD ⁺	Nikotinadenin-Dinukleotid oxidiert
NADH	NAD ⁺ reduziert
NADP ⁺	Nikotinadenin-Dinukleotid-Phosphat oxidiert
NADPH	NADP ⁺ reduziert
n. b.	nicht bestimmt
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD ₅₇₈	Optische Dichte bei 578 nm Wellenlänge
ORF(s)	offene(r) Leserahmen
PEG	Polyethylenglycol
pers.	persönlich(e)
3-PG	3-Phosphoglycerat
PGK(s)	3-Phosphoglycerat-Kinase(n)
pgk-Gen	3-Phosphoglycerat-Kinase-Gen
pM	Picomol
Pos.	Position
RBS(n)	Ribosomen-Bindungsstelle(n)
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
S.	Seite
s.	siehe
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunden
Tab.	Tabelle
TE-	Tris-EDTA-
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNS	Transfer-Ribonukleinsäure
t _{0.5}	Halbwertszeit

U	Unit(s)
UMCGC	University of Wisconsin Computer Group
UpM	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
w/v	Gewichtseinheiten pro Volumeneinheiten
w/w	Gewichtseinheiten pro Gewichtseinheiten
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Abkürzungen von Basen und Nukleotiden

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil
N	nicht genauer spezifizierte Base
ATP	Adenosintriphosphat
CTP	Cytidintriphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
TTP	Thymidintriphosphat
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
ddATP	Didesoxy-Adenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxy-Cytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxy-Guanosintriphosphat
ddTTP	Didesoxy-Thymidintriphosphat

Abkürzungen von Aminosäuren bzw. Aminosäureresten

Drei-Buchstaben-Code:	Ein-Buchstaben-Code:	L-Aminosäure:
Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	D	Asparaginsäure
Asp	N	Asparagin
Asx	B	Asparagin/Asparaginsäure
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
Glx	Z	Glutamin/Glutaminsäure
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin
	X	unbekannte Aminosäure
ini.		Initiations(Start)-Methionin

Anhang: Detaildarstellungen zu den Plasmidkonstruktionen

Abb. A:

Konstruktion von Expressionsplasmid pJFgap-1 mit M. fervidus-gap-Gen

Abb. B:

Konstruktion von Plasmid pBgap mit dem M. fervidus-gap-Gen

Abb. C:

Konstruktion von Plasmid pBTgap mit dem M. fervidus-gap-Gen

Abb. D:

Konstruktion des Mutagenese-Plasmids pMAGap mit M. fervidus-gap-Gen

Abb. E:

Konstruktion von Expressionsplasmid pJFgap-2 mit M. fervidus-gap-Gen

Abb. F:

Konstruktion des Plasmids pMP1800 mit M. fervidus-mdh-Gen

Abb. G:

Konstruktion des Mutagenese-Plasmids pMDH mit M. fervidus-mdh-Gen

Abb. H:

Konstruktion des Expressionsplasmids EX-MDH mit dem M. fervidus-mdh-Gen

Die Erkennungsregionen verwendeter Restriktionsenzyme sind eingerahmt. Zur besseren Orientierung wurden in einigen Fällen kurze Sequenzabschnitte schattiert unterlegt. Start- und Stop-Codons von gap- und mdh-Gen sind, sofern in der Sequenz dargestellt, unterstrichen.

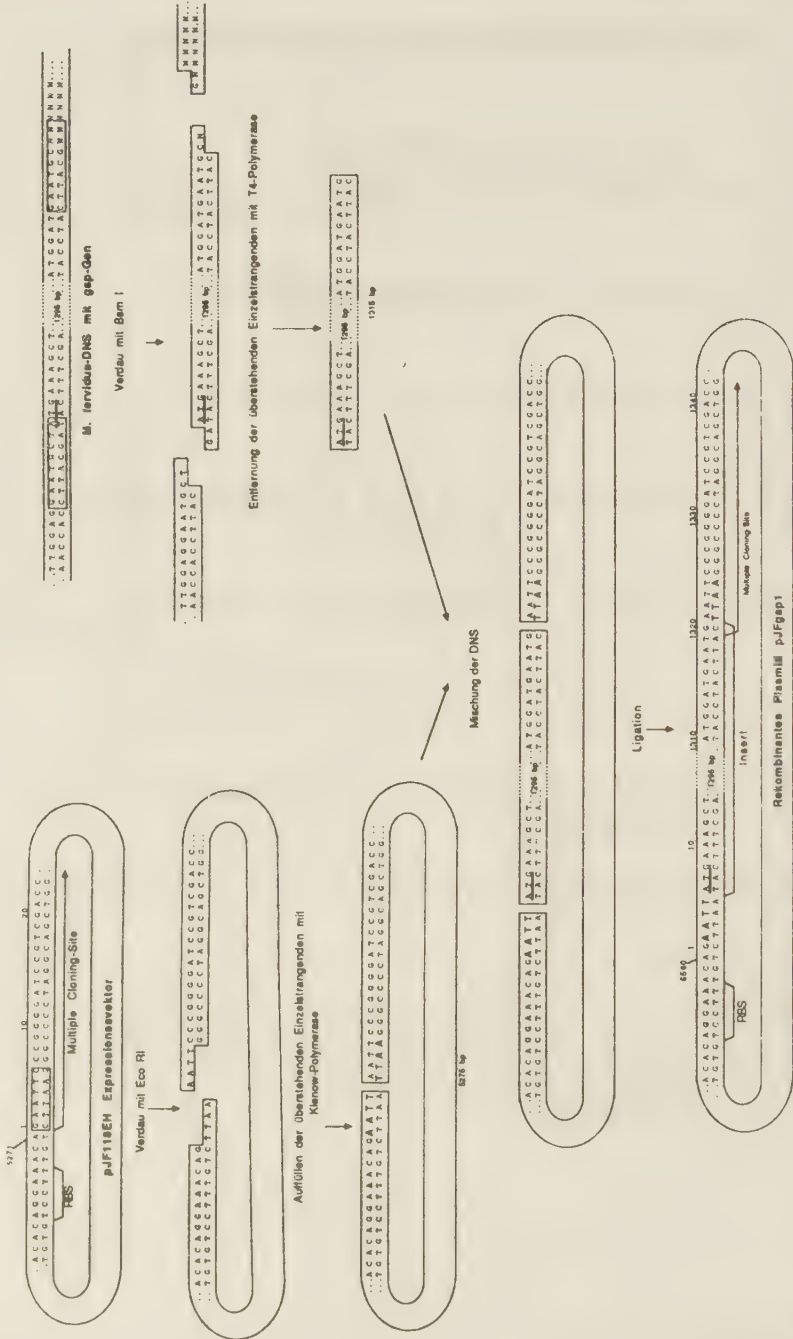


Abb. A

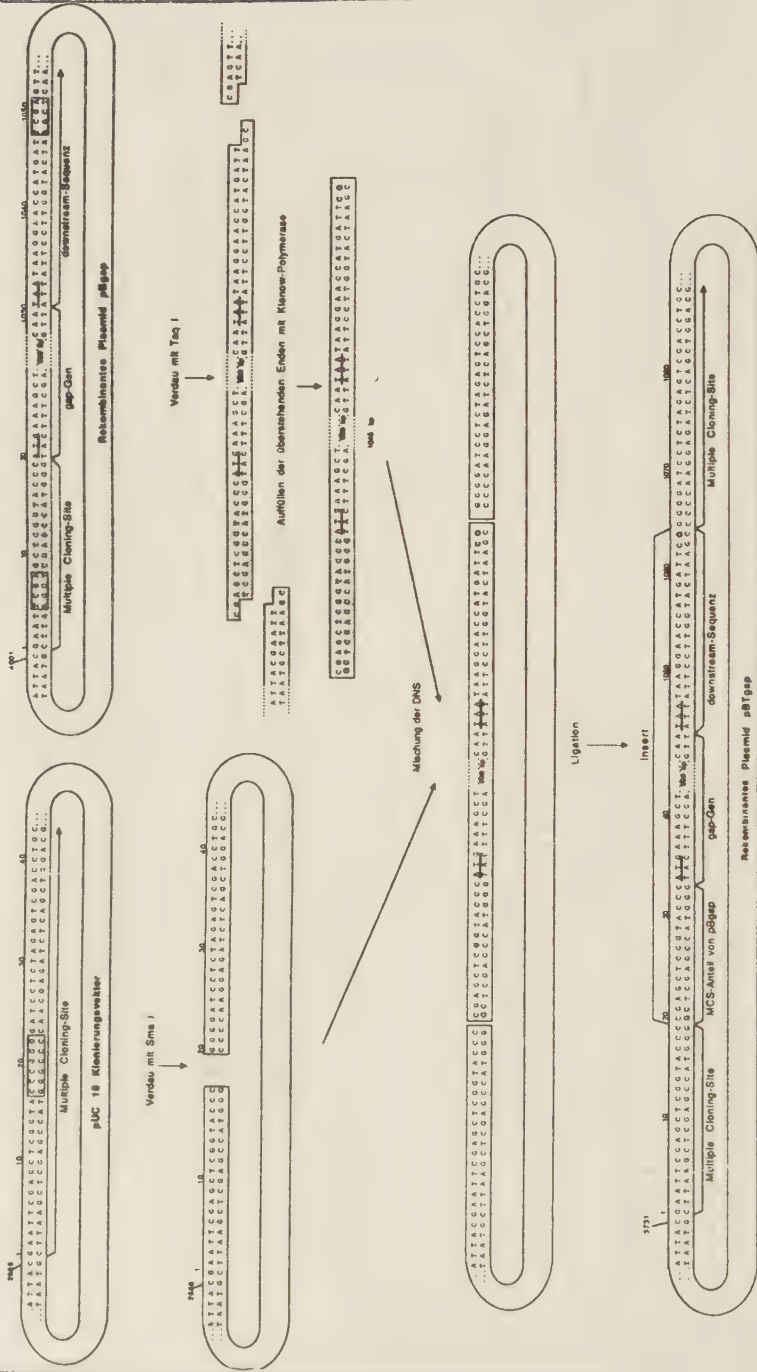


Abb. C

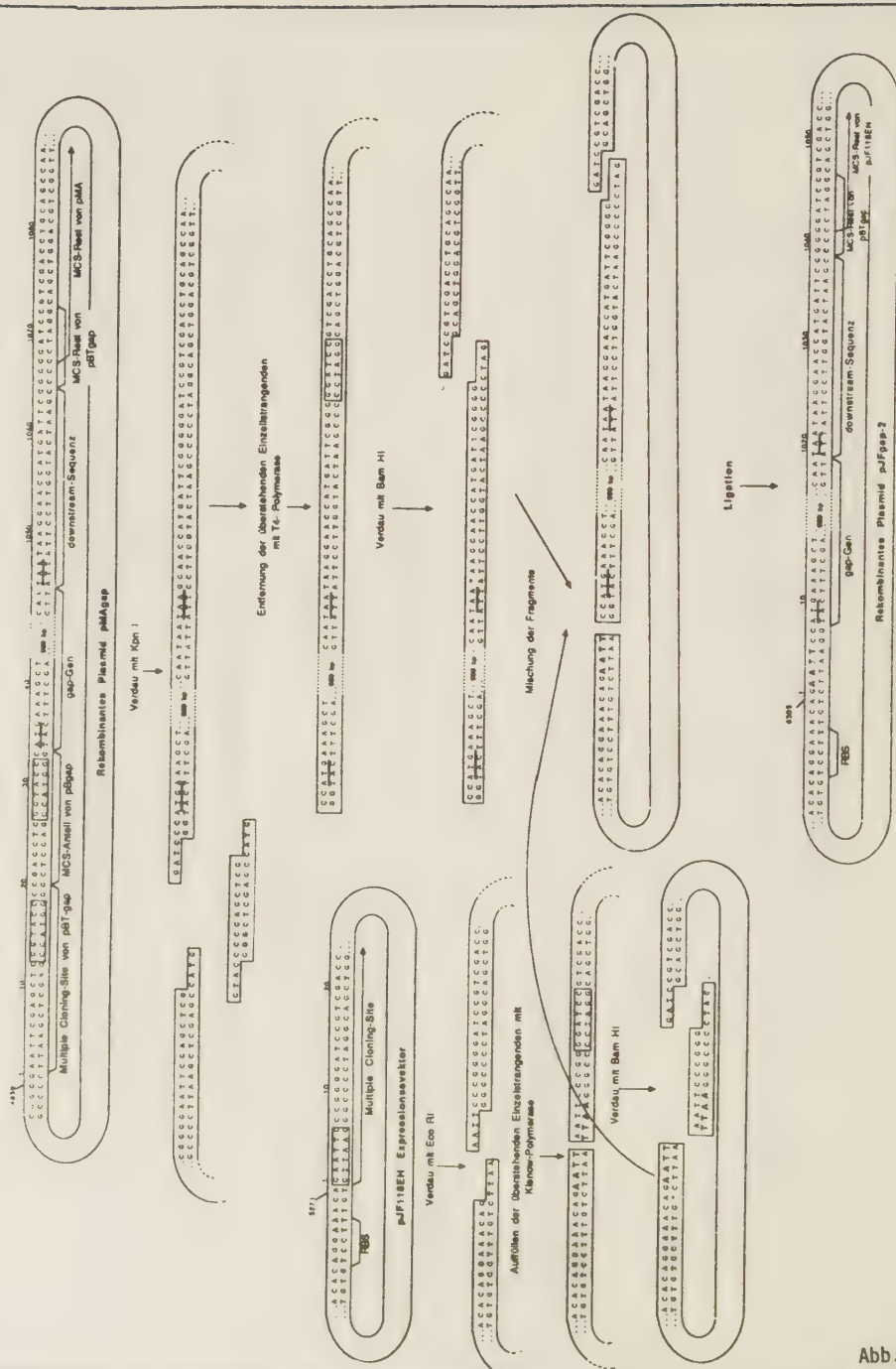


Abb. E

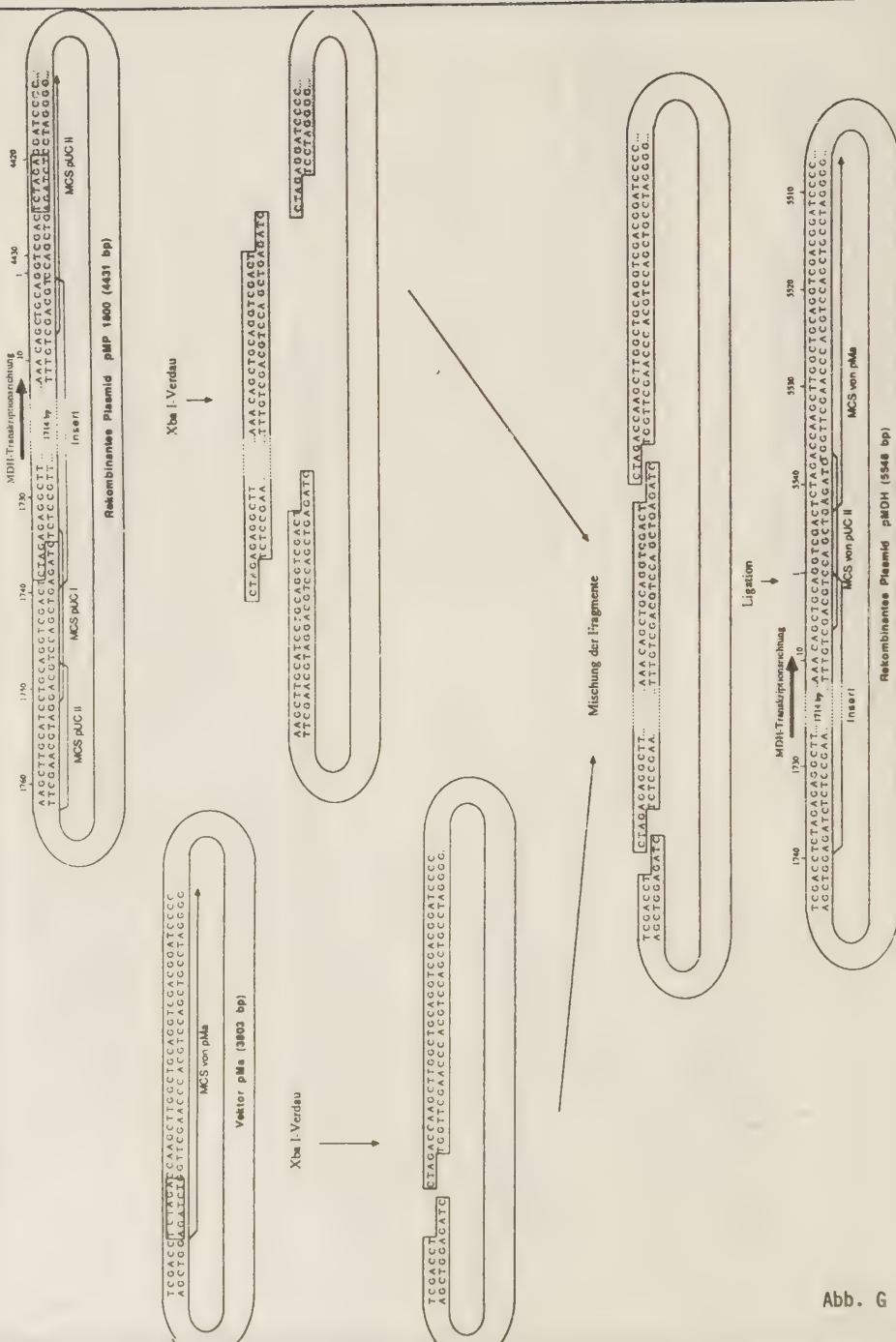


Abb. G

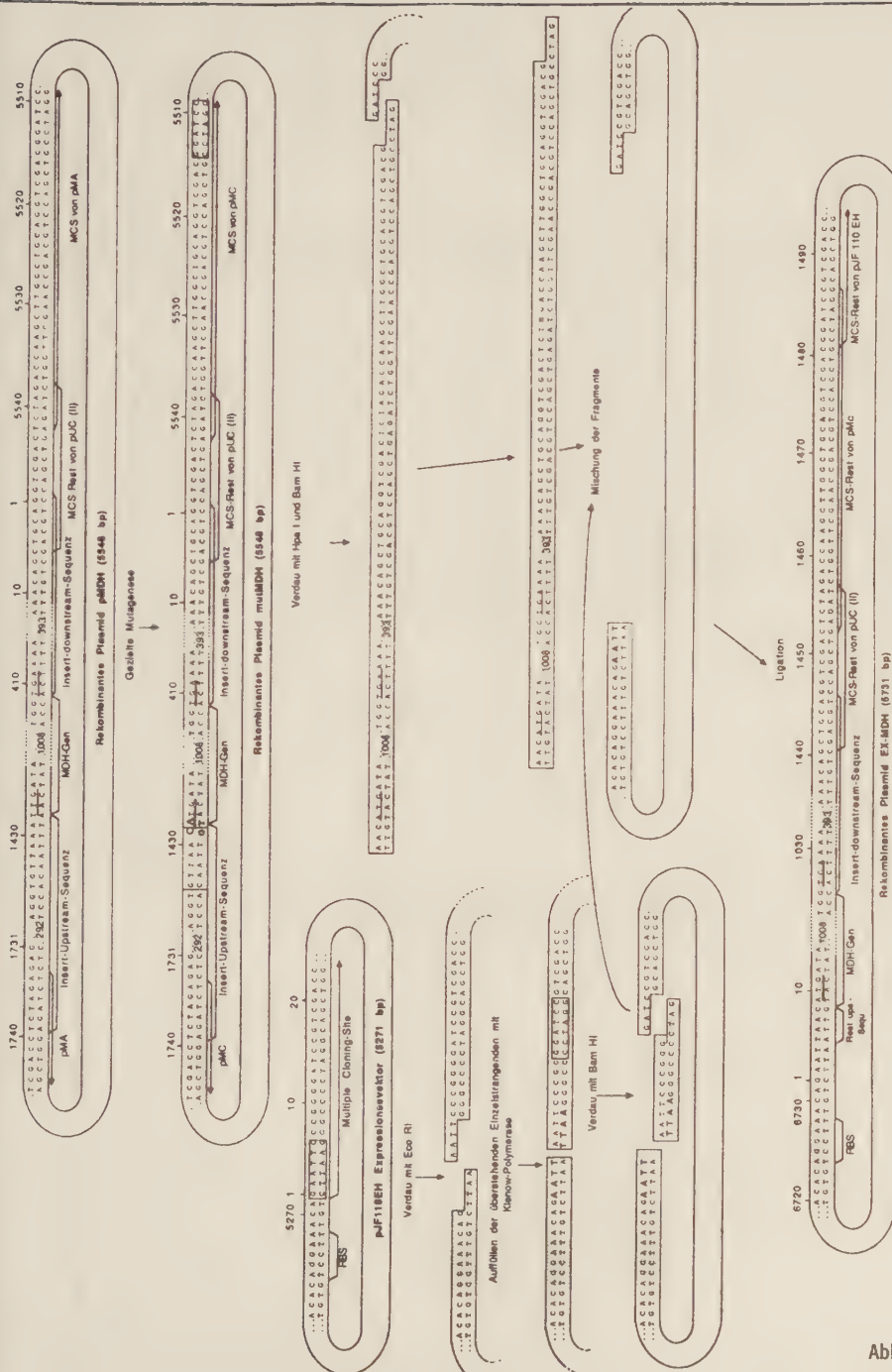


Abb. H

Lebenslauf

1958

Geboren als 1. Sohn des Lehrerehepaares Werner und Marianne Fabry in München

1964-1969

Grundschulzeit

1969-1978

Gymnasialzeit am mathematisch-neusprachlichen Ruppert-Gymnasium (4 Jahre) und am humanistischen Zweig des Wittelsbacher Gymnasiums (5 Jahre) in München

1978

Abitur mit Schwerpunkt Alte Sprachen (Griechisch und Latein)

1978/79

Beginn des Studiums der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

1979

Einberufung zur Ableistung des zivilen Ersatzdienstes. Abbruch des Studiums

1979-1980

Ableistung des Zivildienstes an zwei verschiedenen Einsatzstellen (Arbeiter-Bund und Bayerisches Rotes Kreuz)

1980/81

Wiederaufnahme des Studiums Biologie/Diplom an der LMU München

1982

Vordiplom

1982/83

Beginn des Hauptstudiums, zunächst mit Schwerpunkt physiologische Botanik

1983

Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes

1983-1985

Fortsetzung des Hauptstudiums mit den Fächern Genetik, physiologische Botanik und Immunologie
Regelmäßige Teilnahme als Kursassistent und später als Kursleiter an Grundpraktika am Botanischen Institut

1985

Diplomprüfung mit Hauptfach Genetik und Nebenfächern phys. Botanik und Immunologie

1985-1986

Diplomarbeit unter Leitung von Priv.-Doz. Dr. R. Hensel als Gast am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, Abt. Prof. Dr. W. Zillig

1986-1989

Durchführung der Promotionsarbeit unter Fortsetzung und Erweiterung der in der Diplomarbeit begonnenen Thematik.

Regelmäßige Leitung von Praktika am Botanischen Institut der LMU München und am Max-Planck-Institut Martinsried. Betreuung von Praktikanten sowie Diplomarbeiten im Rahmen der eigenen Tätigkeit.



